



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PURE E APPLICATE_____

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DI BASE E APPLICAZIONI

Curriculum: SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE

CICLO XXXI

TITOLO DELLA TESI

SVILUPPO DI MICRO-TECNICHE "GREEN" PER L'ANALISI CHIMICA

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM 01

RELATORE

Chiar.mo Prof. Achille Cappiello

DOTTORANDO

Dott. Maurizio Piergiovanni

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

Sommario

INTRODUZIONE.....	7
TREND NELL'ANALITICA CONTEMPORANEA	9
GREEN ANALYTICAL CHEMISTRY	12
IL PROCESSO ANALITICO.....	17
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE ED ESTRAZIONE.....	18
TECNICHE DI ESTRAZIONE CONVENZIONALI	20
TECNICHE DI ESTRAZIONE GREEN IN SCALA MICRO.....	24
MEMBRANE SEMIPERMEABILI E ANALISI DIRETTE.....	33
METODI DI SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA	38
SISTEMI DI RIVELAZIONE: LA SPETTROMETRIA DI MASSA	46
INTERFACCE LC-EI-MS E STATO DELL'ARTE	59
PARTE SPERIMENTALE	71
CAPITOLO 1: L'INTERFACCIA LIQUID-EI	72
ABSTRACT	72
INVENZIONE DELL'INTERFACCIA LIQUID ELECTRON IONIZATION	74
PRIMO PROTOTIPO	79
SECONDO PROTOTIPO	94
TERZO PROTOTIPO	113
USO DI UN'INTERFACCIA LIQUID-EI IN APPLICAZIONI CON APPROCCIO "DILUTE AND SHOOT"	121
ABSTRACT	121
ESPERIMENTI QUANTITATIVI IN FLOW INJECTION ANALYSIS	123
DETERMINAZIONE DI FLUNITRAZEPAM IN RESIDUI DI ALCOLICI	125
DETERMINAZIONE DI DIETILFTALATO IN PRODOTTI PER LA CURA DELLA PERSONA.....	129
DETERMINAZIONE DI IDROSSITIRSOLO E TIROSOLO IN CAMPIONI DI OLIO EXTRAVERGINE D'OLIVA .	132
MONITORAGGIO ONLINE DI REAZIONI CHIMICHE CON LA COMBINAZIONE DI MEMBRANE ED INTERFACCIA LIQUID-EI (CP-MIMS-LEI-MS/MS).....	137
ABSTRACT	137
MONITORAGGIO ONLINE DI REAZIONI DI CHIMICA ORGANICA IN SOLVENTI NON ACQUOSI	139
CONCLUSIONI	149
CAPITOLO 2: SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO GREEN PER L'ESTRAZIONE IN SCALA MICRO DI BENZODIAZEPINE DA RESIDUI DI BEVANDE	151
ABSTRACT	151
LA TEMATICA: I DRUG FACILITATED CRIMES.....	152
BENZODIAZEPINE COME ARMA DEL CRIMINE	153
SVILUPPO DEL PROTOCOLLO DLLME E DELLA CROMATOGRAFIA.....	155

CONCLUSIONI	166
COPYRIGHTS	167
BIBLIOGRAFIA	169
RINGRAZIAMENTI	181

INTRODUZIONE

Dare delle definizioni è un'operazione ardua in quanto non è sempre possibile riuscire a sintetizzare in poche parole i contenuti ed i principi identificatori di qualcosa di estremamente vasto ed articolato. Wikipedia, non è una delle fonti più autorevoli nel mondo scientifico ma certamente una delle più consultate dal pubblico generalista, definisce la chimica analitica come *“la branca della chimica che copre le attività volte all'identificazione, alla caratterizzazione chimico-fisica e alla determinazione qualitativa e quantitativa dei componenti di un determinato campione”* (1). Questa definizione, per quanto efficace e pur essendo tra le più flessibili, non riesce a trasmettere la complessità, la diffusione e la vastità dei campi di impiego della chimica analitica nella scienza. Nel 1994 Bruce Kowalski definì la chimica analitica come *“the science of chemical information”* (2) riassumendo la vera essenza di questa scienza in due parole, *chimica* ed *informazione*, le quali delimitano rispettivamente la sua caratteristica di base ed il suo obiettivo. A seguito di un'ampia riflessione, Miguel Valcárcel ne riassunse tutta l'essenza affermando:

“Analytical chemistry is a metrological science that develops, optimizes and applies material, methodological and strategic tools of widely variable nature (chemical, physical, mathematical, biochemical, biological, etc.) which materialize in measuring processes intended to derive quality (bio)chemical information of both a partial [presence-concentration-structure of bio(chemical) analyte-species] and global nature on materials or systems of widely variable nature (chemical, biochemical and biological) in space and time in order to solve measuring problems posed by scientific, technical and social problems” (3).

Quest'ultima definizione, pur avendo oltrepassato i 20 anni, è tuttora quella maggiormente condivisa nel mondo scientifico in quanto estende l'essenza della chimica analitica anche al di fuori del suo campo di applicazione canonico. Oggigiorno varie tecniche appartenenti a questo ambito vengono impiegate con successo anche in settori quali le scienze naturali, la biologia molecolare, la diagnostica clinica ed anche in ambito forense; il prefisso stesso *“chimica”*, è forse superato. L'analitica, praticata soprattutto come chimica analitica ed a lungo identificata col lavoro stesso del chimico, si sta sviluppando come una disciplina a sé stante il cui ruolo copre ormai tutti i rami della scienza e della tecnologia. Questa natura

interdisciplinare è enfatizzata dalla diversa natura dei fenomeni utilizzati durante la fase di misurazione, quali ad esempio (4):

- 1) Chimica
- 2) Fisica
- 3) Informatica
- 4) Elettronica
- 5) Scienze dei materiali
- 6) Biologia
- 7) Chemiometria

I dati quali-quantitativi ricavati con le varie tecniche permettono una comprensione sempre più approfondita della problematica analizzata ed un più rapido avanzamento della conoscenza e della tecnologia. Questo sottolinea due aspetti di estrema importanza:

- 1) La chimica analitica è sempre più centrale e riveste ruoli di elevata importanza in tutti gli ambiti di interesse, ben al di fuori della chimica. Questo fa sì che l'interesse nei suoi confronti stia diventando sempre più elevato e con ciò gli investimenti in ricerca e sviluppo; basti pensare che durante il secolo scorso, in quegli stati dove la sanità non godeva dei progressi tecnologici, la glicemia per la diagnosi del diabete veniva stimata "assaggiando" l'urina del paziente alla ricerca del sapore dolce indice della presenza di zuccheri (5). Oggi non solo questa è un'analisi di laboratorio routinaria, ma addirittura sono presenti in commercio strumenti portatili che permettono una misurazione in situ effettuata dal diretto interessato.
- 2) La distanza che separa i vari campi di applicazione richiede un'elevata versatilità per poter "rispondere" ad analiti, matrici e parametri molto diversi. In tutto ciò, la ricerca in ambito strumentale ha portato ad una iper-specializzazione con tantissime tecniche e strumentazioni dedicate in grado di dare elevatissime prestazioni per ogni applicazione. Di conseguenza anche i parametri e le molecole analizzabili sono sempre maggiori, con quantità minime rilevabili ancora inferiori. Mentre in passato tutta l'analitica passava da beuta e buretta, oggi ogni campo di applicazione ha un vasto *pattern* di tecniche da cui attingere informazioni.

Sulla base di quanto descritto in precedenza risulta chiaro come l'analitica sia una disciplina trasversale la quale deve coniugare prestazioni, rapidità ed affidabilità.

TREND NELL'ANALITICA CONTEMPORANEA

Nel XXI secolo l'uomo contemporaneo si trova davanti una serie di sfide antitetiche tra loro. Da una parte il momento storico che sta decorrendo identifica il proprio nemico nel tempo; ogni avanzamento ottenuto dalla tecnologia in qualsiasi campo ha permesso una forte velocizzazione del processo stesso. Questi miglioramenti sono sempre abbinati anche ad un incisivo miglioramento delle prestazioni o, quanto meno, ad un mantenimento delle stesse. Dall'altra parte la tematica ambientale ha preso piede andando a rivestire ruolo di forte centralità nello sviluppo dello stile di vita e dei beni materiali. Nessuna nuova tecnologia presentata può definirsi valida se prevede un impatto ambientale maggiore rispetto a quella che va a sostituire. La chimica, essendo tra i settori a maggior impatto, ha svolto un ruolo di protagonista; già nei primi anni 30 negli Stati Uniti un primo concetto di rivisitazione dei flussi operativi nell'ottica di moderare le ricadute sull'ambiente era stato proposto. Oggi che la chimica è stata completamente ripensata in modo da limitarne gli effetti sull'ambiente, anche l'analitica è stata rivisitata in chiave *green* con una particolare attenzione alla sostituzione di solventi pericolosi ed inquinanti con altri meno dannosi e, soprattutto, sulla riduzione delle quantità impiegate nei vari step di lavoro. Questo secondo aspetto, ben più incisivo del primo, passa attraverso la minimizzazione della quantità di campione trattata, fattore che determina, di conseguenza, il consumo di tutto il resto.

Se da una parte i progressi sono volti al miglioramento di strumenti e metodi, sia dal punto di vista ambientale che dal punto di vista della produttività, la maggior parte degli sforzi sono dedicati al miglioramento delle prestazioni.

Quando si parla di prestazioni analitiche non si pensa alla massima grandezza analizzabile ma piuttosto al limite di rivelabilità (*Limit Of Detection*, LOD). Il limite di rivelabilità è la minima quantità di analita a cui può essere associato con certezza un segnale rivelato con un determinato metodo (6). Questo significa che al di sotto di questo valore non sarà più possibile distinguere dal rumore il segnale dovuto al composto investigato; di fatto, solitamente nella maggior parte delle strumentazioni anche il "bianco" genera un segnale. Il suo concetto è strettamente correlato al limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ), definito come la minima quantità di analita associabile ad un dato quantitativo

affidabile. Il LOD strumentale è anche fortemente influenzato dalla procedura con cui viene calcolato. Due scuole di pensiero vengono ampiamente accettate dal mondo scientifico:

- 1) La IUPAC definisce il LOD come:

$$LOD = 3\alpha / S$$

(LOD è il limite di rivelabilità, α è la deviazione standard del segnale ed S è la pendenza della curva di calibrazione.

- 2) Il LOD è spesso definito come la quantità corrispondente ad un rapporto segnale/rumore (*signal-to-noise* ratio, S/N) maggiore o uguale a 3.

Grazie ai progressi permessi dallo sviluppo strumentale, spinto principalmente dai miglioramenti in campo elettronico ed informatico, i limiti LOD e LOQ diventano sempre più bassi con ovvi vantaggi in termini di informazioni acquisibili da ogni campione. Di conseguenza, anche gli aggettivi associati ai valori di concentrazione vanno rivisitati. La IUPAC propone la seguente classificazione (Tabella 1).

<i>General name of analyte</i>	<i>Analyte concentration</i>	<i>Examples</i>
Sub-microtrace component	< 1 ppt	Dioxins in various matrices
Ultra-microtrace component	< 1 ppb	Trihalomethanes in drinking water or human urine.
Microtracce component	< 1 ppm	Carbon monoxide in ambient air
Trace component	< 100 ppm	Methane in ambient air
Secondary component	< 1%	Carbon dioxide in ambient air
Primary component	1-100%	Oxygen in waste gases or flue gases

Tabella 1. Classificazione di metodi e tecniche analitiche in base alla concentrazione dell'analita (4).

Per le molte strumentazioni odierne determinare composti alla concentrazione dell'ordine dei ppb o ppt è parte della normalità; i LOD ed i LOQ di queste macchine sono varie migliaia di volte più piccoli rispetto ai sistemi precedenti. Analisi di componenti in ultra-micro tracce come, ad esempio, i triometani nell'acqua potabile sono divenute di routine e non richiedono particolari accorgimenti o preparazione da parte dell'operatore; così la definizione stessa di composto in tracce presentata dalla IUPAC appare obsoleta.

Grazie ai progressi nelle prestazioni è possibile una miglior comprensione del mondo microscopico con evidenti risvolti nel progresso della ricerca a tutti i livelli ed anche in ambito di sicurezza alimentare, ambientale o forense. L'identificazione di molecole come, ad esempio, i biomarkers in particolari patologie o di alcuni composti anomali nel plagio alimentare è stata possibile solo grazie ai progressi della tecnologia descritti in precedenza.

Lo sviluppo dell'analitica moderna quindi persegue l'obiettivo di mettere a disposizione strumenti e metodiche affidabili, riproducibili e performanti, nel massimo rispetto dell'ambiente e che garantiscano la massima produttività. Tra le tecniche che meglio riassumono l'insieme di queste caratteristiche emergono le tecniche ifenate (*hyphenated*, dal termine inglese *hyphen* corrispondente al trattino di unione usato per congiungere due parti di una parola composta) e, in particolare, la combinazione di cromatografia e spettrometria di massa.

GREEN ANALYTICAL CHEMISTRY

L'attenzione alla sostenibilità delle attività umane iniziò ad emergere già nel periodo compreso tra i due conflitti mondiali. La cosiddetta *chemurgy* prevedeva l'impiego di materie prime provenienti dalla produzione agricola rinnovabile in sostituzione dei derivati del petrolio o dei prodotti dell'industria mineraria (7). Per comprendere l'incisività del concetto basti pensare che nel 1935 venne fondato il *Farm Chemurgic Council* tra i cui promotori figurava la Ford Motor Company di Henry Ford. Con l'avvento del secondo conflitto mondiale e dei successivi decenni di crescita e benessere l'idea "chemurgica" venne accantonata fino ai primi anni 90. Il primo "mattoncino" venne deposto nel 1999, quando Paul Anastas pubblicò una serie di linee guida raccolte sotto il nome di "green chemistry" con l'obiettivo di ripensare la chimica del futuro (8). Questi principi, divenuti oggi pietra miliare per la storia della chimica, sono riassunti nei 12 punti presentati di seguito:

- 1) Prevenzione
- 2) Rispetto dell'economia atomica
- 3) Riduzione delle sintesi pericolose
- 4) Progettazione di composti più sicuri
- 5) Uso di solventi e altri componenti ausiliari più sicuri
- 6) Efficienza energetica
- 7) Uso di materie prime rinnovabili
- 8) Riduzione degli step che generano ulteriori scarti
- 9) Uso di catalizzatori
- 10) Biodegradabilità
- 11) Analisi in tempo reale per prevenire l'inquinamento
- 12) Impiego di composti e reazioni nelle condizioni più sicure

La messa in pratica di queste regole ha avuto e sta avendo risvolti decisivi nel presente e nel futuro, basti pensare all'importanza assunta dalle nanotecnologie e dalla "*green chemical engineering*". Oggi la tematica *green chemistry* è così centrale che proprio quest'anno il premio Nobel per la chimica è stato attribuito parimerito a Frances H. Arnold per i suoi studi su applicazioni di enzimi nella produzione industriale green (9).

Anche l'analitica, nonostante il suo limitato impatto ambientale, è stata fortemente influenzata dalla *green-chemistry*: cromatografia e preparativa sono stati gli ambiti in cui sono stati fatti i maggiori progressi a riguardo. Vari approcci metodologici per il miglioramento del processo analitico sono mostrati in Tabella 2.

Trend	Specific tendency	Description
Methodological	Solventless sample preparation techniques	It is an example of application of "green chemistry" principles into analytical practice
	Development of speciation analytics	Speciation analytics in the process loading and determination of the different compounds and its different physical forms and element
	Application of sum parameters	Total parameters describe the total content and gives element in all the pollutants or in a particular subgroup of pollutants in a sample under investigation
	Introduction of biomonitoring and bioanalytics	In practice the following problems are discussed: <ul style="list-style-type: none"> - The use of results of chemical analytics of biota samples to evaluate pollution of the abiotic part of the environment - Fauna and flora observation - Immunoanalysis and bioassays
	Simultaneous determination of many analytes using one sample in one analytical cycle	High efficiency capillary columns used in chromatography are an excellent example of this approach

Tabella 2. Descrizione delle varie tendenze nel miglioramento di vari aspetti nel processo analitico.

L'idea di affiancare un prototipo di *green analytical chemistry* (GAC) al concetto di *green chemistry* risale al 2000 e agli studi di Namieśnik (10). Nonostante la sua ridotta incidenza in termini assoluti, ci sono vari aspetti che evidenziano come l'applicazione di tecniche sicure per l'ambiente ha dato un importante contributo nel rendere green anche altri ambiti (11).

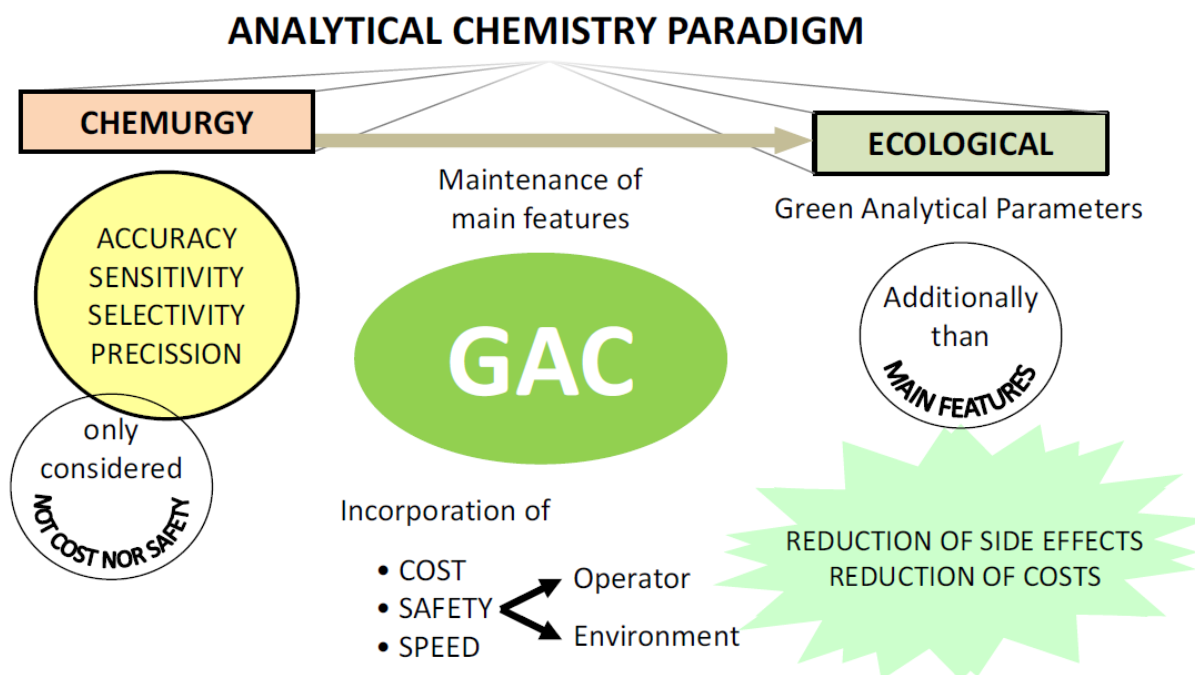


Figura 1. Evoluzione della *green analytical chemistry*, dal paradigma chemiurgico a quello ecologico (12).

La GAC è stata la chiave di volta nel passaggio dal paradigma chemiurgico al paradigma ecologico in analitica, creando uno strumento per la combinazione di analisi *eco-friendly* ed economiche (Figura 1). La sfida da affrontare era quella di raggiungere un compromesso tra il continuo miglioramento delle prestazioni e l'aumento della compatibilità ambientale. Partendo dai principi 1, 5, 6 ed 8 della *green chemistry*, una nuova serie di regole è stata sviluppata modellandola alle esigenze dell'analitica. Questi nuovi principi, 12 esattamente come per la *green chemistry*, sono i seguenti:

- 1) Analisi dirette devono essere impiegate per evitare pretrattamenti del campione.
- 2) Minimizzare dimensioni e numero di campioni deve essere un obiettivo da perseguire.
- 3) Analisi in situ devono essere scelta preferenziale.
- 4) L'integrazione di processi analitici ed operazioni varie riduce gli sprechi di energia e l'uso di reagenti.
- 5) Metodi miniaturizzati ed automatizzati devono essere scelta preferenziale.
- 6) La derivatizzazione deve essere evitata quando possibile.
- 7) La produzione di grandi volumi di rifiuti deve essere evitata e la sua gestione deve essere effettuata compatibilmente con la natura stessa degli scarti.

- 8) Metodi multi-parametrici o multi-analita devono esser preferiti alle tecniche che monitorano un solo composto alla volta.
- 9) L'uso di energia deve essere evitato.
- 10) Reagenti prodotti da fonti rinnovabili devono esser preferiti a reagenti di sintesi.
- 11) Reagenti tossici devono essere eliminati o sostituiti.
- 12) La sicurezza dell'operatore deve essere continuamente incrementata.

Le analisi da remoto con misurazione diretta di campioni privi di trattamenti preliminari sono il sogno *green* dell'analista moderno; nonostante molto sia stato fatto in questa direzione, per molte applicazioni la fase preparativa risulta imprescindibile. Per questi motivi, nonostante i concetti della GAC siano stati definiti da tempo, il passaggio da approccio qualitativo (definizione dei principi) a quello quantitativo (miglioramento misurabile dei vari parametri interessati) è stato ben più lento rispetto all'evoluzione della scienza in altri settori (12). La chiave di volta nell'implementazione dei principi della GAC nell'analitica contemporanea è stata la miniaturizzazione: riduzione del volume di campione estratto o iniettato, riduzione del volume di solventi o fasi adsorbenti, riduzione del volume di scarti prodotto e del volume di fase mobile (come funzione del tempo necessario per la separazione cromatografica) impiegato (13).

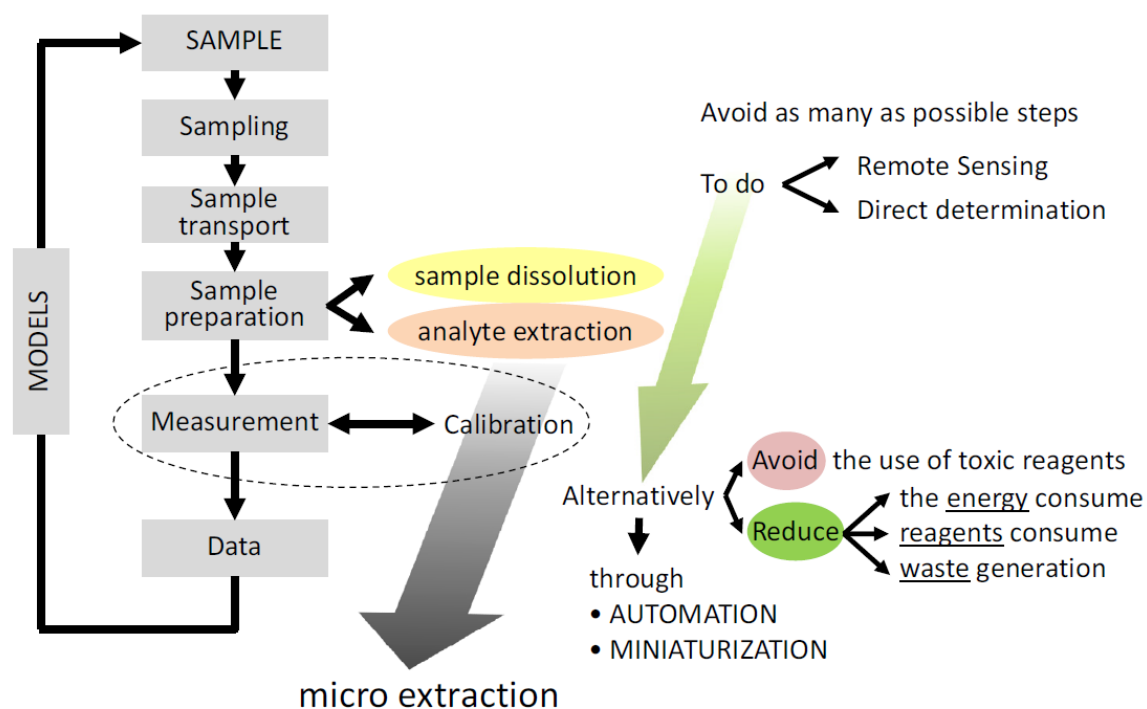


Figura 2. Strategie per rendere *green* le procedure analitiche (12).

Questo processo, abbinato alla sostituzione di solventi pericolosi con altri sicuri, la riduzione di step energivori con la massima preferenza a trasformazioni a temperatura ambiente e tanti altri miglioramenti marginali, ha determinato le caratteristiche dell'analitica moderna che conosciamo (Figura 2).

IL PROCESSO ANALITICO

Come già ampiamente discusso nella parte precedente, l'analitica è una disciplina ampiamente trasversale che copre applicazioni e condizioni di lavoro molto diverse tra loro. Ciononostante, come emerge andando a comparare metodiche analitiche di settori diversi reperibili in letteratura, l'iter seguito dalle procedure è praticamente il medesimo. La qualità del risultato di un'analisi dipende dalla accuratezza di tutte le procedure sperimentali che, a partire dalla matrice del campionario, portano al risultato finale. Gli errori compiuti nei vari step concorrono a determinare l'errore complessivo del risultato; risulta quindi necessario dedicare la massima attenzione a tutti gli aspetti e non solo all'analisi in quanto tale.

In maniera molto generale i principali passaggi in cui si articola il processo analitico sono i seguenti:

1. Campionamento
2. Preparazione del campione
3. Analisi

Il campionamento è il primo step di ogni procedura analitica e costituisce di fatto il prelievo dell'aliquota su cui verrà applicato il metodo. Ogni matrice presenta diverse problematiche ed accortezze da adottare ma, in generale, si possono ricordare alcuni principi generali. Il campione prelevato deve essere quanto più "fedele" possibile (*significativo*) della presenza e concentrazione degli analiti di interesse nella matrice esaminata e, per garantire questo requisito, va stabilito un punto di campionamento rappresentativo, vanno ridotte al minimo le disomogeneità al momento del prelievo e minimizzate le contaminazioni successive o i fenomeni di degradazione chimico-biologiche. Diverse strategie sono state studiate per ognuno dei punti elencati sopra ma la loro disamina esula dagli obiettivi di questa tesi di dottorato e la si rimanda ad altre sedi.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE ED ESTRAZIONE

I campioni da analizzare, salvo casi estremamente particolari, sono composti da atomi di diversi elementi, presenti con diversi stati di ossidazione, e legati ad altri atomi a loro volta diversi e presenti in molecole diverse; l'insieme di tutte le molecole del campione a parte l'analita è definito *matrice*. Anche il più semplice dei campioni è composto da migliaia di molecole, tra le quali però, solo una o poche sono di interesse per l'analista. Queste molecole possono a loro volta contribuire a sopprimere o promuovere determinate caratteristiche del composto di interesse che vengono impiegate nel processo di rivelazione. Questo fenomeno, largamente conosciuto come effetto matrice (*matrix effect, ME*) può essere così incisivo da emulare il segnale di un composto non presente (*falso positivo*) o sopprimere completamente la presenza di un composto presente (*falso negativo*). Contestualizzando questo fenomeno nella delicatezza dell'analitica nei suoi vari ambiti di applicazione, il risultato di questi errori può essere estremamente dannoso (14). L'effetto matrice è stato largamente studiato nel mondo scientifico e sono state messe a punto ed accettate diverse strategie per mitigarne le conseguenze, tra cui il metodo delle aggiunte standard e la calibrazione a standard interno. Matuzevsky (15) divulgò una semplice strategia per la quantificazione dell'effetto matrice che viene largamente accettata ed impiegata dalla comunità scientifica. Questa procedura prevede la quantificazione di due campioni a concentrazione nota recanti la stessa quantità di analita ma preparati, uno in matrice "post-extraction" e l'altro in solvente (il quale ci si aspetta che sia equiparabile a un bianco). Il rapporto tra il segnale registrato in presenza della matrice (S_{sample}) e quello con il solo solvente ($S_{\text{spiked blank}}$) potrà differire solo per la compresenza di altre molecole. La formula impiegata è la seguente:

$$\text{Matrix effect (\%)} = \frac{S_{\text{sample}}}{S_{\text{spiked blank}}} * 100$$

L'effetto matrice percentuale potrà quindi essere sia maggiore che minore di 100 a seconda che ci si trovi, rispettivamente, in condizioni di *signal enhancement* o *signal suppression* (16).

Fatta questa doverosa premessa, utile per sottolineare la potenziale interferenza della matrice nel risultato analitico, appare evidente che la fase di preparazione del campione sarà volta a ridurre le conseguenze. Nella preparativa, spesso identificabile con l'estrazione, il

campione viene processato in modo da isolare il più possibile composto di interesse all'interno del più piccolo volume possibile: questo sia per rimuovere eventuali interferenti che per aumentare la concentrazione analizzata. Ulteriori passaggi chimici o biochimici possono essere coinvolti ma si tratta di approfondimenti di minor interesse in questa panoramica. Tra le operazioni preliminari all'analisi vanno citate la centrifugazione, la filtrazione, la sedimentazione, la digestione, la distillazione, l'idrolisi, la diluizione e tante altre ancora. Ogni tecnica strumentale prevede delle procedure preparative dedicate in modo da rendere l'analisi efficace, prestazionale e riproducibile. Nella chimica delle piccole molecole organiche oggetto di questo lavoro di tesi, la preparativa più comune è l'estrazione.

Estrarre un composto significa fondamentalmente rimuovere la matrice (17); questa definizione data da Janusz Pawliszyn appare particolarmente adeguata in quanto sposta il focus dall'analita a tutte le molecole che lo circondano.

Nell'analitica moderna la parte di preparazione del campione è stata oggetto di pesanti rivisitazioni; sempre più metodiche sono state sviluppate con approcci diretti o semi-diretti come il "dilute-and-shoot" o l'uso di tecniche cosiddette "ambient" dove nessuna preparazione o solo qualche semplice passaggio come la diluizione sono previsti. Il trend generale prevede che ogni passaggio non strettamente fondamentale per il risultato finale venga rimosso o quantomeno semplificato. L'estrazione è infatti uno step nel quale non viene ottenuto nessun risultato analitico e che risulta spesso poco riproducibile essendo generalmente il primo imputato in caso di risultati insoddisfacenti.

TECNICHE DI ESTRAZIONE CONVENZIONALI

Ricollegandosi ai paragrafi precedenti, emerge come la fase estrattiva sia particolarmente limitante in termini di produttività in quanto esosa a livello di tempo, sia di lavoro che di tempi morti (come ad esempio digestioni o idrolisi enzimatiche). Inoltre, l'uso di fasi assorbenti di difficile smaltimento o di solventi inquinanti per le estrazioni va in forte contrapposizione con i principi della *green analytical chemistry*; anche eventuali processi termici o l'uso di microonde sarebbero da evitare o da sostituire con processi non energivori (18).

Attualmente, per la maggior parte delle metodiche analitiche, l'estrazione rimane una parte imprescindibile. Le principali tecniche per campioni liquidi sono suddivisibili, in due grandi famiglie:

- 1) Liquido – liquido
- 2) Solido – liquido

L'estrazione liquido – liquido (*Liquid – Liquid Extraction, LLE*) è una delle tecniche più antiche e conosciute; prevede l'impiego di un solvente da aggiungere al campione che quindi andrà ad arricchirsi delle molecole a lui affini. Il solvente estraente deve essere immiscibile con il solvente della matrice e soprattutto deve presentare una forte affinità per il composto di interesse. Il trasferimento dei soluti tra le due fasi è regolato dalle leggi di trasferimento di materia, dove uno dei parametri chiave è la superficie esposta; il sistema bifasico va infatti agitato per un tempo prestabilito in modo da formare una fine dispersione di solvente estraente e campione che permette di massimizzare il rapporto superficie/volume.

Terminato questo step meccanico, le due fasi si separano in quanto immiscibili andando a posizionarsi l'una sopra all'altra sulla base del valore di densità. La fase estraente viene quindi ulteriormente trattata o anche iniettata direttamente se compatibile col sistema analitico utilizzato.

L'estrazione liquido-liquido è una tecnica veloce e che non richiede l'acquisto di apparecchiature dedicate (salvo l'imbuto separatore). I composti si trasferiscono dal campione alla fase estraente in base alla diversa affinità per i due solventi. Questa caratteristica è rappresentata dalla costante P_{ow} ovvero *coefficiente ottanolo – acqua* o *coefficiente di partizione*; si tratta di un valore numerico calcolato per ogni composto a

condizioni di pressione e temperatura normali (1 atm e 25°C) che indica come questo si ripartisce in condizioni di equilibrio tra l'ottanolo (fase idrofoba) e l'acqua (fase idrofila). Per comodità la P_{ow} è spesso utilizzata in forma logaritmica come segue:

$$\log P_{ow} = \log \frac{[solute]_{octanol}}{[solute]_{water}}$$

Indicando $[solute]_{octanol}$ e $[solute]_{water}$ come le concentrazioni del composto rispettivamente in ottanolo ed acqua, si ottiene un valore che indica idrofilicità o idrofobicità rispettivamente in base a quanto è minore o maggiore di zero. L'estrazione liquido – liquido è una tecnica ancora radicata nei laboratori di analisi in quanto economica e relativamente veloce nonostante siano state sviluppate valide alternative in grado di ovviare ai suoi punti deboli. Estrahendo con solvente matrici complesse come ad esempio molti campioni ambientali o biologici molte altre molecole verranno co-estratte assieme all'analita di interesse andando di fatto a limitare l'utilità di questo passaggio. I solventi impiegati per estrarre soluzioni acquose sono spesso nocivi e tossici, quindi in forte contrasto coi principi della GAC; inoltre, considerato che la quantità di estraente usata può essere anche varie volte il volume di campione, la problematica assume maggior rilevanza. Per i suddetti motivi la maggior parte dei migliori solventi sono stati infatti sostituiti con alternative più sicure ma anche meno efficaci. La LLE è dunque una tecnica estrattiva efficiente ed efficace solo per analiti molto affini al solvente estraente e che presentano polarità fortemente diversa dal resto dei componenti della matrice. In accordo coi principi della GAC varie tecniche alternative prive di solventi sono state studiate e messe a punto (Figura 3).

Tra le alternative presentate è presente anche l'estrazione solido – liquido (*Solid – Phase Extraction, SPE*) citata in precedenza. I suoi principi di funzionamento sono analoghi alla liquido – liquido ma con alcune differenze; in questo caso il composto estratto deve instaurare interazioni con una fase estraente solida che saranno di tipologia ed intensità diverse rispetto ad un solvente liquido (19). La procedura prevede che il campione, preventivamente omogeneizzato e separato da residui solidi, venga fatto passare attraverso una fase adsorbente solida dedicata. Questo materiale verrà scelto in base alle interazioni instaurabili con gli analiti in modo da riuscire a trattenerli selettivamente a discapito della matrice. Di fatto questo passaggio appare come una via di mezzo tra una separazione

cromatografica (ma gli analiti non vengono eluiti in questa fase) ed una filtrazione dove la separazione è sulla base delle caratteristiche chimiche e non in base alle dimensioni.

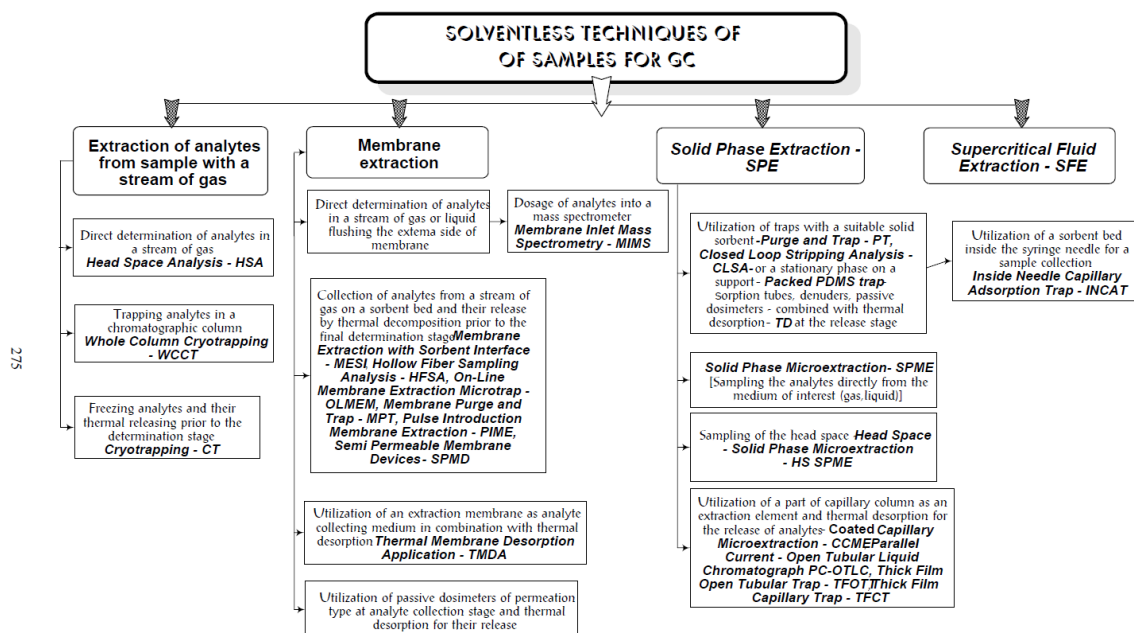


Figura 3. Schema di tecniche alternative alla LLE per varie applicazioni che non necessitano di solventi (2).

Un primo condizionamento con lo stesso solvente di cui è composto il campione è fondamentale come preliminare all'estrazione per pulire ed andar a ripristinare le condizioni nelle quali la fase adsorbente dovrà interagire con gli analiti. Una volta caricato il campione e fatto passare attraverso la fase solida, questa si sarà arricchita dei composti in grado di instaurare interazioni più forti con esso di quelle che ha con la matrice. La cartuccia viene quindi lavata con lo stesso solvente usato nel condizionamento (o una sua miscela piuttosto simile), asciugata con un flusso di gas ultrapuro ed inerte ed infine eluita. In quest'ultimo step, il solvente (o la miscela di solventi) usato per rimuovere i composti dalla fase solida deve instaurare con essi interazioni di maggior intensità di quelle presenti con la fase solida adsorbente, in modo da trasportarli col flusso di liquido nel volume di estratto. Quest'ultimo passaggio può esser ripetuto più volte per aver la certezza di pulire al meglio la cartuccia e recuperare tutto l'analita estratto. Tutta la suddetta procedura è schematizzata in Figura 4.

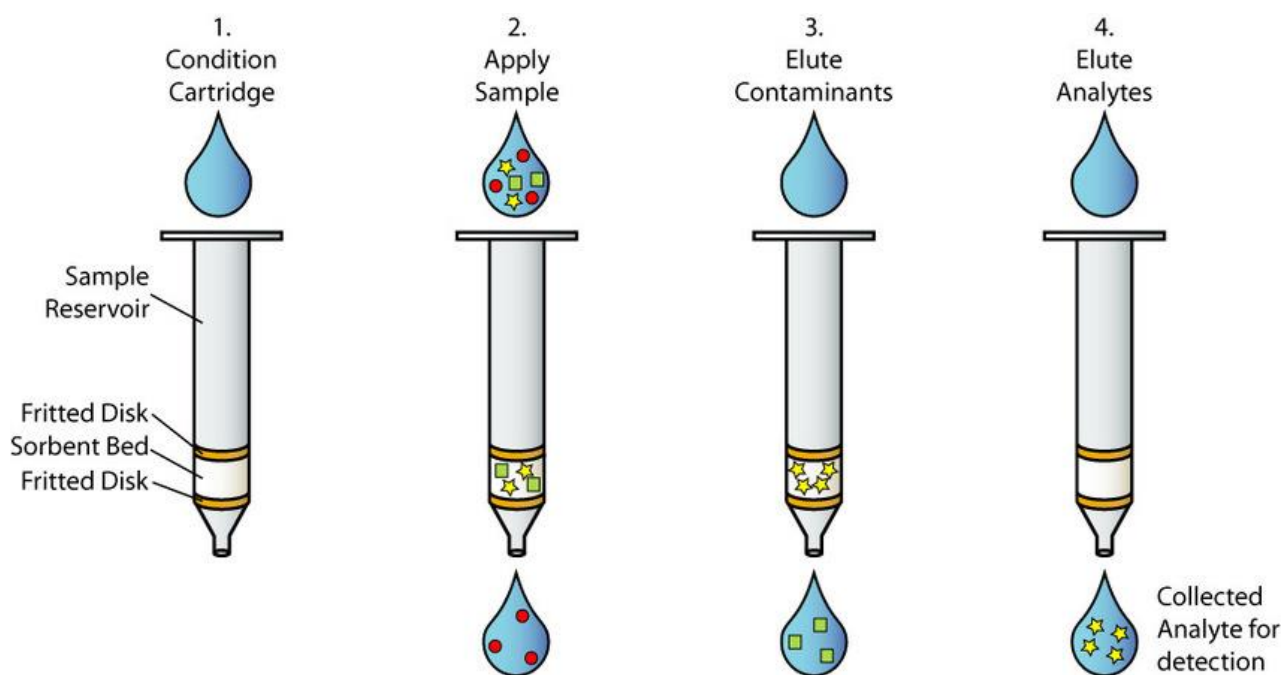


Figura 4. Schematizzazione delle operazioni fondamentali in un'estrazione SPE (20).

Comparata all'estrazione liquido – liquido, la solido – liquido riesce a rispettare meglio i principi della GAC: solo piccole quantità di solvente vengono utilizzate durante lavaggi ed eluzione e la fase adsorbente è riutilizzabile per varie decine di volte (21). La SPE risulta particolarmente vantaggiosa per analiti in tracce in quanto, andando ad estrarre grandi volumi di campione, permette un'elevatissima pre-concentrazione tale da rendere la concentrazione finale a valori rilevabili anche per tecniche strumentali a basse prestazioni; in questo caso, a differenza della LLE, non è necessaria l'evaporazione al *rotavapor* di grandi quantità di solvente dall'estratto, con ovvi vantaggi in termini di efficienza, costi e tempo. La SPE attualmente è ampiamente automatizzabile nella versione *on – line*: la cartuccia estraente viene installata in serie in un sistema HPLC posizionata precedentemente alla colonna cromatografica. Con le opportune accortezze è possibile far fare tutta l'estrazione e la rivelazione comprensiva di separazione cromatografica direttamente nel sistema stesso senza tempi morti e senza rischio di perdere materiale durante le varie manipolazioni.

TECNICHE DI ESTRAZIONE GREEN IN SCALA MICRO

Lo sviluppo delle tecniche estrattive è stato portato avanti seguendo principalmente due delle dodici linee guida della “green analytical chemistry”: la sostituzione di solventi nocivi o comunque dannosi per l’ambiente con altri più sicuri e la riduzione delle quantità impiegate in termini di solventi, campione, scarti ed energia. Le variabili da tenere in considerazione per rendere un protocollo estrattivo green sono riassunte in Figura 5.

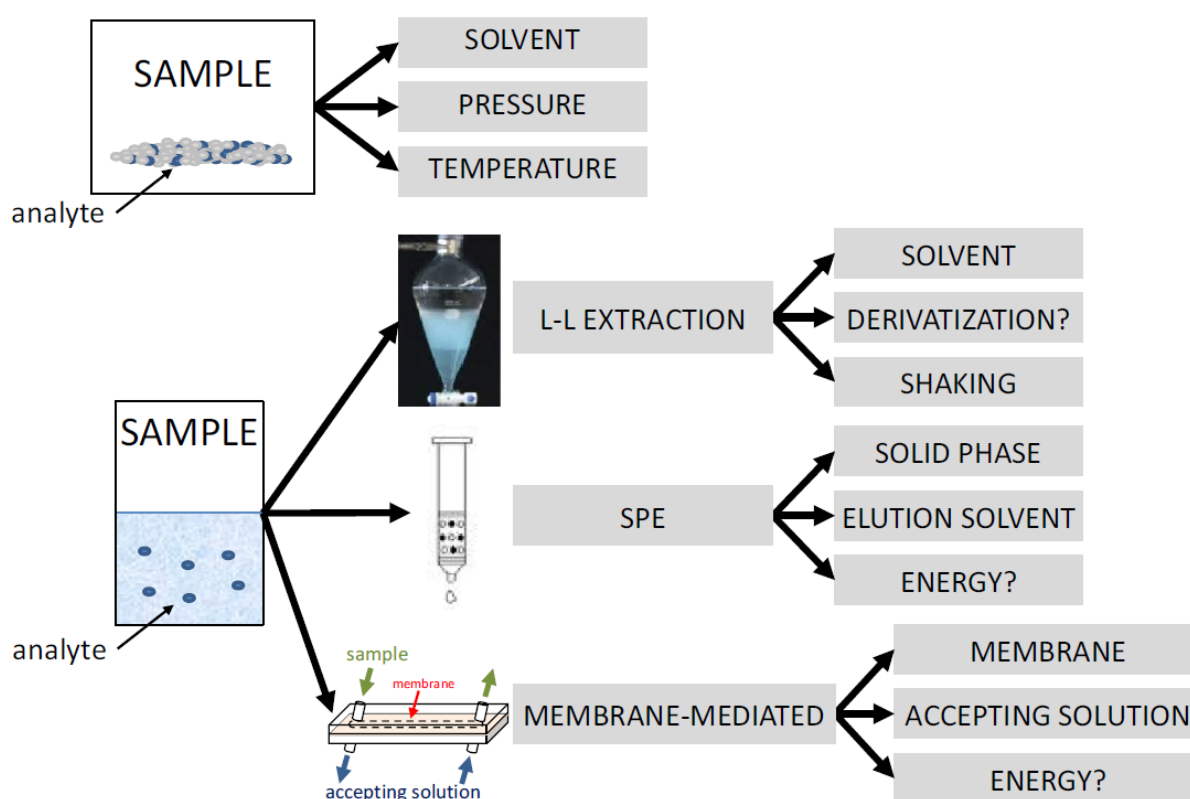


Figura 5. Aspetti da considerare nell’evoluzione di tecniche estrattive in ottica GAC (12).

Nell’ottica della GAC entrambe queste strategie sono ampiamente migliorabili, soprattutto in termini di prodotti di scarto (solventi estraenti e fasi esauste adsorbenti) e di quantità di campione impiegata. Proprio per rispondere ai suddetti principi, le tecniche liquido – liquido e solido – liquido sono state oggetto di un intenso processo di miniaturizzazione dal quale sono nate nuove varianti in grado di garantire prestazioni equivalenti, se non migliori, pur con quantità di campione ridotte di qualche ordine di grandezza.

La microestrazione in fase solida (*Solid-Phase MicroExtraction SPME*) è una tecnica basata sull’utilizzo di una fibra di silice fusa, rivestita esternamente da una piccola quantità di fase

stazionaria adsorbente. Questa tecnica è stata sviluppata da Pawliszyn e collaboratori nel 1989 (Arthur, Pawliszyn, 1990) e migliorata negli anni a seguire fino a diventare una delle strategie estrattive migliori sotto tutti i punti di vista (22). Il protocollo prevede che la fibra venga esposta al campione in modo da arricchirsi degli analiti a lei affini. Una volta completata l'estrazione, gli analiti vengono desorbiti direttamente nello strumento analitico senza ulteriori passaggi. La SPME è stata sviluppata per rispondere alla crescente esigenza di metodi rapidi e affidabili, in grado di rispondere ai principi della GAC e di riassumere in un unico step l'estrazione e la purificazione. La SPME trova una perfetta combinazione nelle tecniche gascromatografiche in quanto, gli analiti vengono termo-desorbiti direttamente nell'iniettore e di fatto, si può considerare incorporata anche la determinazione analitica finale. Nel caso di accoppiamento con la cromatografia liquida (LC) deve essere implementata una eluizione con solvente in modo da recuperare gli analiti che saranno poi iniettati; questo passaggio può essere automatizzato per aumentarne l'efficienza. I principali vantaggi della SPME possono essere riassunti come segue:

1. il consumo di solvente è ridotto al minimo se non azzerato;
2. per l'esecuzione dell'analisi è sufficiente una piccola quantità di campione;
3. gli step preliminari sono semplici e veloci;
4. il processo di preparazione del campione può essere automatizzato;
5. gli analiti vengono sia estratti che pre-concentrati da qualsiasi tipo di matrice;
6. sono possibili anche campionamenti on-site e in vivo.

La fibra estraente è realizzata in silice fusa (lunga circa 1 cm e con diametro di 0,110 mm) ricoperta da una piccola quantità di fase estraente (nell'ordine di 1 μ L con spessore compreso tra 7 e 100 μ m); questo è solitamente una fase polimerica ad alto peso molecolare (PM), simile a quelle impiegate per le fasi stazionarie nelle colonne GC, o un adsorbente solido altamente poroso, per aumentare l'area accessibile per l'adsorbimento. La fibra così rivestita è connessa ad un'astina che funge da pistone e viene fatta scorrere all'interno di un ago. Il sistema che ne risulta è commercializzato col nome di *holder* (Figura 6).

La procedura SPME si compone di una prima fase di estrazione in cui la fibra, precedentemente termo-condizionata, viene esposta nello spazio di testa del campione (o

immersa nel campione liquido) da analizzare; in questo step, gli analiti vanno ad adsorbirsi sulla fibra fino al raggiungimento di un equilibrio con la concentrazione residua nel campione. Il tempo di estrazione è un parametro fondamentale che deve essere opportunamente ottimizzato. Terminato questo step, la fibra viene ritratta nell'ago e segue la fase di desorbimento, direttamente nell'iniettore per gascromatografia o in una camera di desorbimento se segue un'analisi con cromatografia liquida. Tutta la procedura estrattiva può essere automatizzata, ottenendo un miglior rispetto di tempi e volumi per una maggiore ripetibilità dell'analisi.

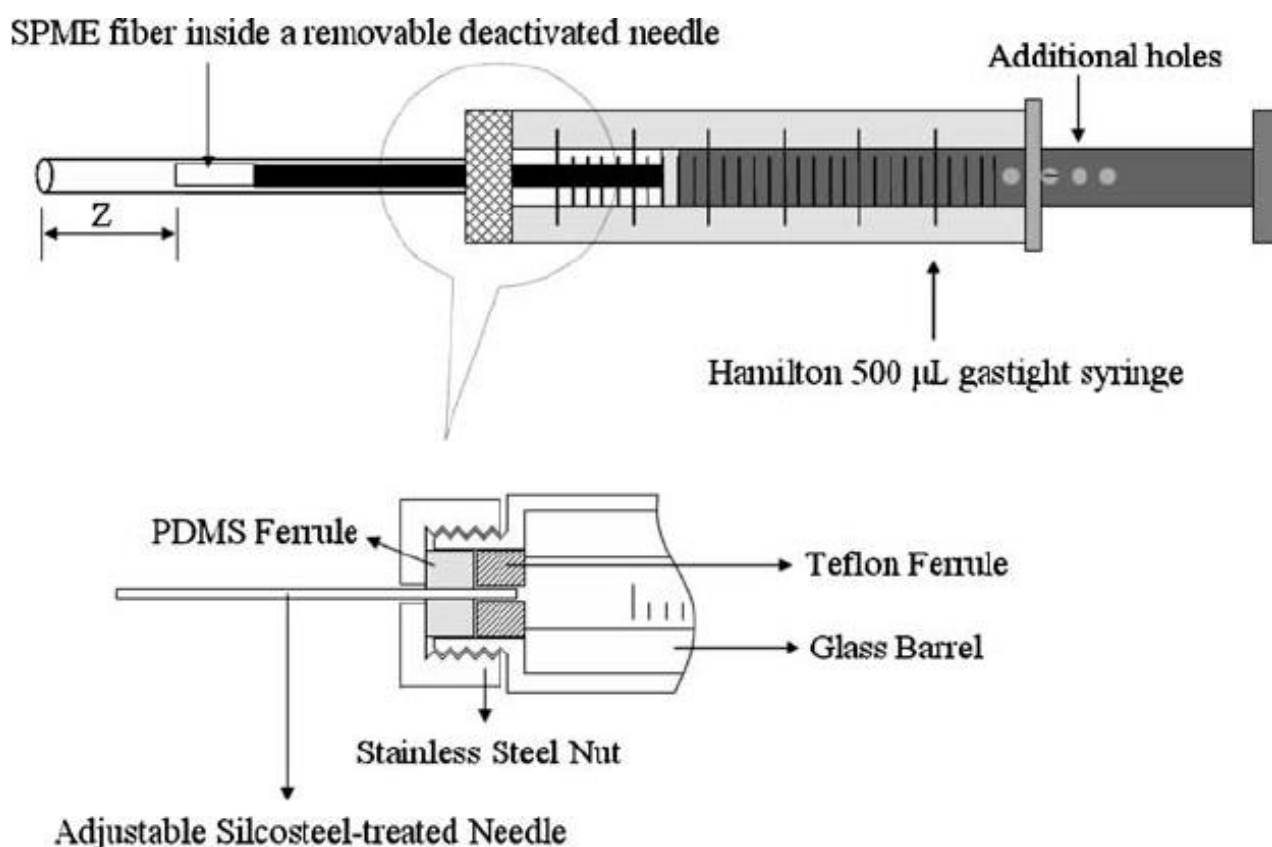


Figura 6. Sezione dell'holder SPME con dettaglio della fibra estraente e del suo posizionamento nell'ago (23).

Successivamente alla SPME un'altra tecnica microestrattiva solido – liquido è stata sviluppata, messa a punto e commercializzata. La *Micro Extraction by Packed Sorbents* (MEPS) è un'alternativa alla SPME basata su un dispositivo dotato di una cartuccia interposta tra l'ago ed il pistoncino di una siringa (manuale o meccanizzata); in questa maniera, durante il passaggio del campione aspirato si vengono a instaurare delle interazioni tra gli analiti e la fase adsorbente contenuta all'interno della cartuccia che ne permettono la separazione dal resto della matrice (Figura 7). Diversamente dalla SPME, nella MEPS la fase adsorbente è

posizionata dopo l'ago e richiede che il campione sia aspirato all'interno della siringa; nonostante la tipologia di interazioni col campione sia la stessa (di fatto le fasi adsorbenti sono le medesime), questo fattore determina un'efficienza e ripetibilità ben maggiore.

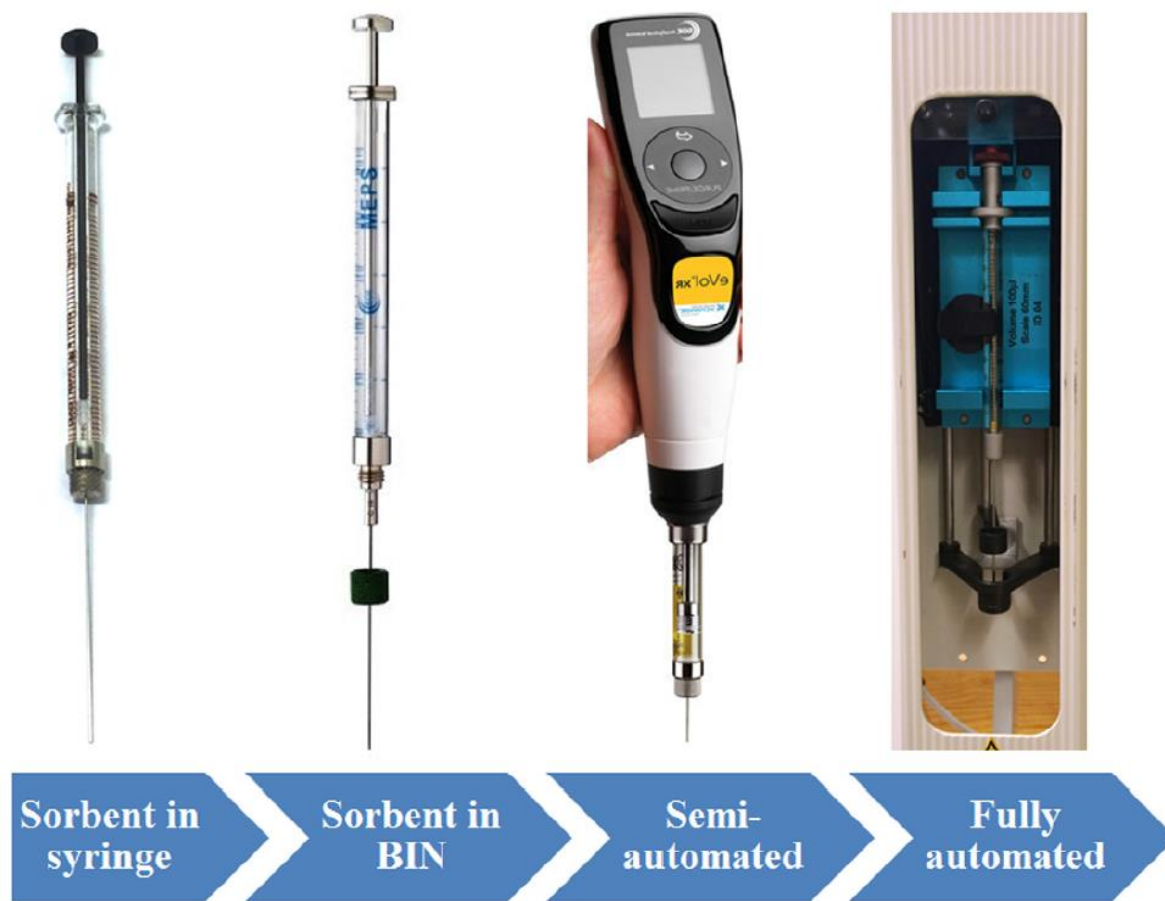


Figura 7. Cartucce MEPS e varie tipologie di siringhe, manuali, automatiche e semiautomatiche.

Infatti, nella MEPS il volume di campione trattato è dettato dal volume della siringa impiegata e l'interazione con gli analiti non è conseguenza dalla loro migrazione per differenza di concentrazione dal bulk del liquido alla fase stazionaria, ma bensì è forzata dal suo passaggio attraverso la cartuccia (Figura 8). Sul campione può esser ripetuta l'estrazione più volte in modo da massimizzare l'efficienza estrattiva senza dover aspettare il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico come nelle tecniche solido – liquido.

Successivamente alla fase di adsorbimento, la cartuccia caricata di analiti viene prima lavata (come nella SPE/SPME) ed infine eluita con un'apposita miscela. Il lavaggio è importante per rimuovere quelle molecole della matrice che sono rimaste sulla superficie della fase

adsorbente e che potrebbero dare effetto matrice. L'eluizione può essere effettuata direttamente all'interno dell'iniettore del GC/HPLC con ovvi vantaggi in termini di efficienza e produttività; ovviamente sia l'ago che il solvente utilizzato dovranno essere compatibili col sistema cromatografico impiegato.

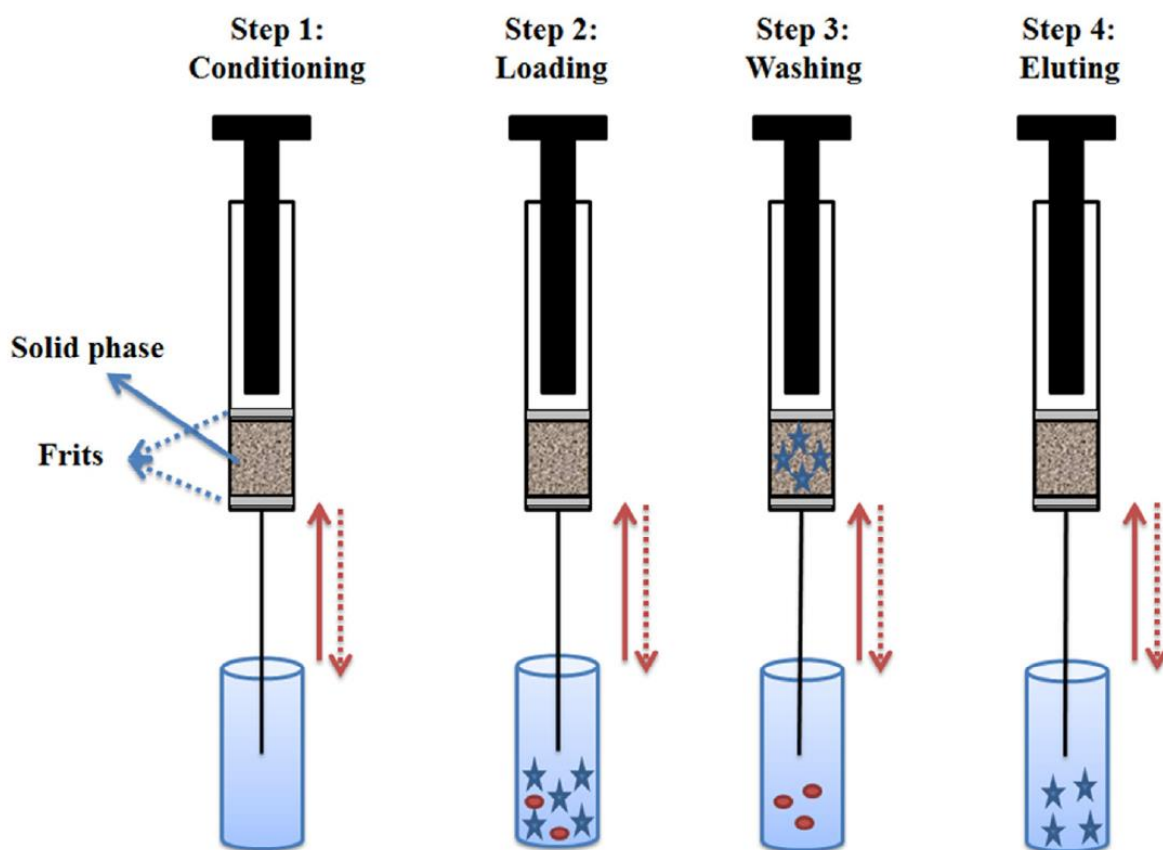


Figura 8. Procedura generale di estrazione MEPS con siringa manuale (24).

Quando l'eluizione non coincide con l'iniezione lo stesso processo può esser ripetuto più volte in modo da aumentare l'efficienza ed evitare fenomeni di *carry over* (ossia presenza di molecole di analita non estratte dalla cartuccia che potrebbero essere eluite in analisi successive andando ad influenzarne i risultati).

La MEPS è una tecnica collaudata, automatizzabile e certamente selettiva vista la possibilità di scegliere tra più fasi adsorbenti; tra i suoi principali vantaggi vi è certamente la capacità di estrarre volumi estremamente ridotti di campione (attualmente 5 μL). A differenza della SPME però, il suo impiego è limitato ai soli campioni in fase liquida. Il fatto di dover far passare il campione attraverso la cartuccia impone però la necessità di doverlo preparare

con filtrazioni o centrifugazioni in modo da rimuovere il particolato solido che potrebbe ostruire la fase solida. Inoltre, campioni ad elevata viscosità sono inadatti a questa tecnica per l'impossibilità di far fluire il liquido a causa dell'eccessiva contropressione; questo limite può essere ovviato con un'opportuna diluizione ma questa scelta non sempre è compatibile con le prestazioni della strumentazione e la concentrazione del campione. Infine, la pre-concentrazione massima ottenibile utilizzando l'estrazione MEPS, estraendo con la siringa di massimo volume (1 mL) ed eluendo con la più piccola (5 μ L), è di 200 volte, sensibilmente inferiore rispetto a quanto possibile con SPME e SPE (25).

Apparentemente in contrapposizione ai requisiti della GAC, che fortemente si oppongono all'uso di solventi e che quindi prediligono le tecniche di estrazione solido – liquido, esiste una variante *green* anche di tecniche liquido – liquido. La *Dispersive Liquid – Liquid Micro Extraction (DLLME)* è una tecnica estrattiva liquido – liquido su scala micro presentata da Assadi nel 2006 per la determinazione di idrocarburi (26) e pesticidi (27) nell'acqua. Oggi la DLLME è stata adattata ad applicazioni molto diverse tra loro andando ad adattarne il protocollo per massimizzarne l'efficienza ed enfatizzarne il caratterere *green*. Nonostante si tratti di una tecnica molto "giovane" è riuscita subito a catturare l'attenzione del mondo della ricerca grazie ai suoi indiscutibili vantaggi ed alla sua semplicità. Dal 2006 ad oggi la DLLME è stata oggetto di oltre 1300 pubblicazioni scientifiche e l'interesse nei suoi confronti risulta ancora in crescendo (28). Nel mondo scientifico viene ritenuta una tecnica *green* in quanto, diversamente dalla LLE convenzionale, nella DLLME le quantità in uso di solvente, campione ed altro vengono minimizzate a valori inferiori al mL. Ciò permette di ridurre ovviamente l'eventuale uso di energia e la produzione di rifiuti. La DLLME inoltre permette l'estrazione di più analiti con caratteristiche di polarità simili, unificando il recupero in un unico step. Il principio di estrazione DLLME, abbastanza simile a quello LLE, si basa sulla formazione di un sistema ternario composto dal campione acquoso in cui viene disciolto un sale ed a cui viene aggiunta una miscela di solventi organici definita fase estraente.

Uno schematico riassunto dei progressi della DLLME dal 2006 al 2016 è riportato in Figura 9.

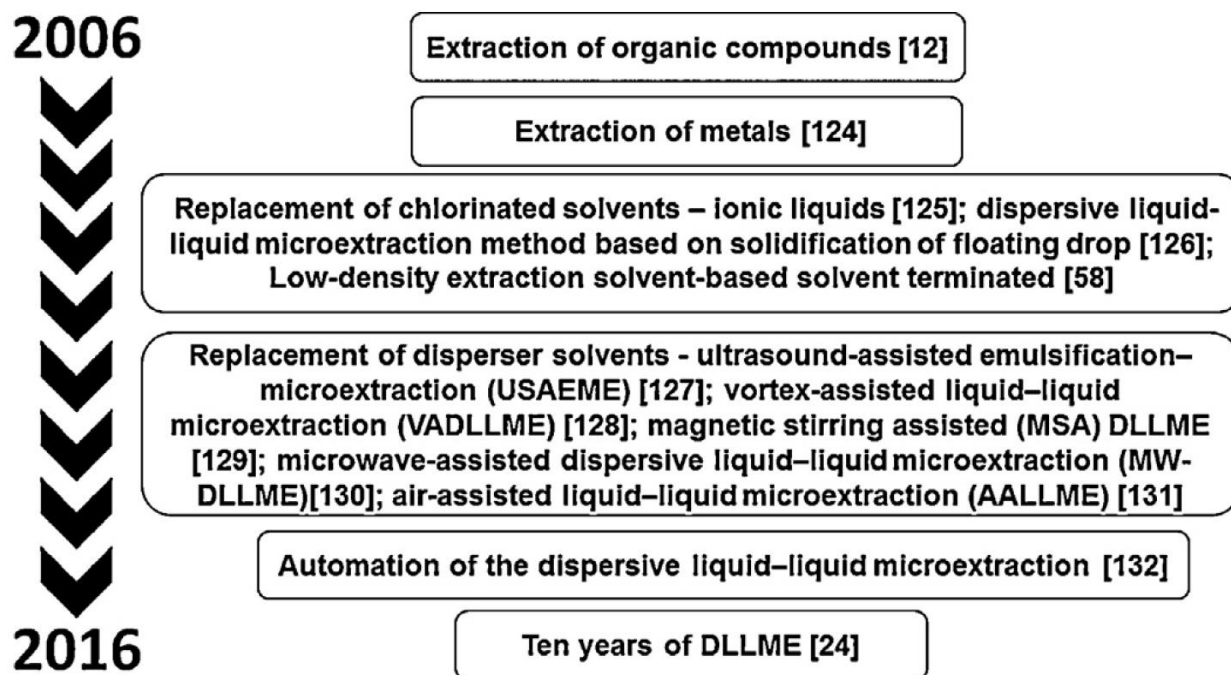


Figura 9. Punti chiave dell'evoluzione della DLLME a 10 anni dalla sua presentazione (28).

Quest'ultima è composta principalmente da (almeno) due componenti:

- 1) *Extractor solvent*: è il componente minoritario della miscela estraente, nonché quello che a fine processo verrà recuperato ed analizzato. Deve essere quanto più affine possibile agli analiti (idoneo indice P_{ow}), non miscibile con l'acqua e possibilmente più denso della matrice. I migliori solventi sotto il punto di vista delle prestazioni sono gli organoclorurati anche se la tendenza è l'impiego di liquidi provenienti da produzioni rinnovabili compatibili con i principi della GAC. Visto comunque il loro impiego in quantità esigue, anche protocolli con solventi leggermente tossici sono considerabili come *green* (29).
- 2) *Dispersive solvent*: è il componente maggioritario della miscela estraente nonché quello che serve a facilitare il trasferimento di materia tra solvente estraente e matrice. Il suo requisito principale è quello di essere miscibile sia con l'acqua che con l'*extractor solvent*. Vengono impiegati in questo ruolo solventi a media polarità, solitamente in grado di accettare un legame a idrogeno come CH_3CN , acetone ed anche qualche alcol a media catena. Il *dispersive solvent* viene impiegato in quantità maggiori e quindi la sua eco-compatibilità è requisito fondamentale.

Componente fondamentale è il sale che serve per garantire l'effetto di *salting out effect* necessario per aver maggior efficienza e migliori recuperi. Il *salting out effect* è un fenomeno di interazione elettrolita – non elettrolita in fase acquosa nel quale il non elettrolita diventa meno solubile ad elevate concentrazione di sale (30) (31). Va comunque sottolineato che esiste una condizione ottimale per favorire i recuperi e che soluzioni sature di sale non necessariamente danno risultati migliori. Stessa scelta di compromesso va attuata per la temperatura come dimostrato da Assadi (26) (32).

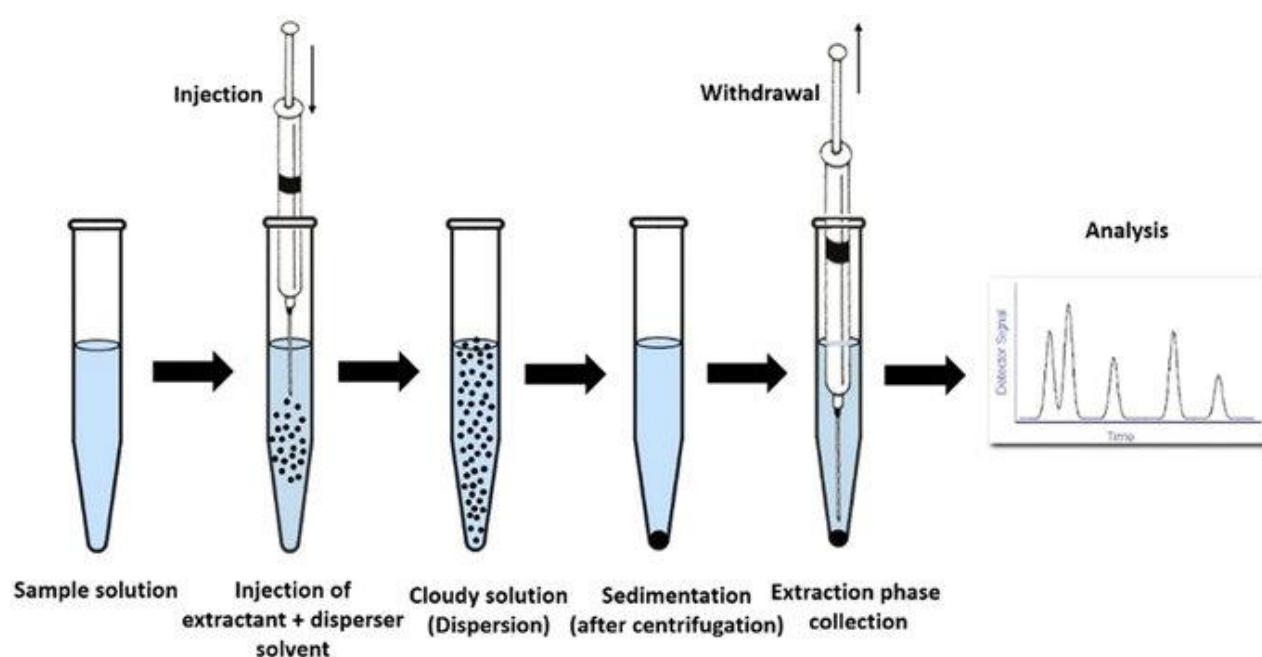


Figura 10. Esempio di procedura di estrazione DLLME generica (33).

Una volta sciolto il sale ed unita la miscela estraente al campione, il sistema viene agitato in modo tale da formare una fine dispersione di gocce di liquido organico all'interno della matrice acquosa così da massimizzare il rapporto area/volume e favorire il trasferimento di materia. Il tempo di agitazione viene definito in modo da permettere il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico tra le due fasi; in questo senso la scelta e la quantità di dispersive solvent sono cruciali. Per ottimizzare proprio questa fase, che risulta essere il tallone d'Achille delle tecniche liquido – liquido, sono state impiegate con successo altre tecniche di agitazione tra cui l'utilizzo di ultrasuoni (*Ultrasound Assisted Dispersive Liquid Liquid Micro Extraction*, UA-DLLME) (34). Gli ultrasuoni risultano particolarmente vantaggiosi in quanto in grado di indebolire i legami a idrogeno tra analiti ed acqua facilitandone il

passaggio in fase organica (35). Segue una centrifugazione per ri-separare le due fasi e poter recuperare quella organica, ora arricchita degli analiti, nel fondo della provetta. L'estratto può essere quindi iniettato o sottoposto a derivatizzazione o tirato a secco per poter solubilizzare i composti in solvente idoneo.

I vantaggi della DLLME sono la sua versatilità, la sua semplicità (pochi passaggi, tutti a temperatura ambiente o simile), la sua economicità (non sono richieste attrezzature dedicate) e la non-necessità di trattamenti preliminari particolari. Inoltre, il fatto che i volumi di sovente estrattore siano inferiori al volume di campione garantisce un fattore di arricchimento fondamentale per il miglioramento dei limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) (36). D'altro canto il vincolo di non miscibilità in acqua del solvente estrattore ne limita la gamma di analiti estraibili e questo, unito alla difficile automatizzabilità del metodo ne ostacola la diffusione nella pratica routinaria.

Tra le tecniche microestrattive, oltre alle tre citate sopra, molte altre sono state sviluppate e messe a punto anche se il loro campo di applicazione è storicamente rimasto limitato a pochi ambiti di nicchia. In questo lavoro di dottorato l'attenzione è stata focalizzata in particolare su MEPS e DLLME in quanto, nonostante siano tecniche legate a principi chimico – fisici diversi, sono accumulate dalla potenzialità di estrarre efficientemente una quantità ridotta di campione coerentemente con i principi della green chemistry. Grazie a queste caratteristiche sono tecniche di estremo interesse per quelle applicazioni, solitamente forensi, in cui il campione è in quantità particolarmente limitata.

MEMBRANE SEMIPERMEABILI E ANALISI DIRETTE

Esistono tecniche strumentali in grado di acquisire il dato analitico in maniera diretta, spesso senza ricorrere alle estrazioni: la più diffusa di esse è il *Purge-and-Trap*. Questo sistema è particolarmente utile per composti volatili solubilizzati in matrici liquide come ad esempio i triometani nelle acque o gli aromi negli alimenti; per poter trattare sia i composti volatili che i non volatili, invece, si stanno recentemente affermando le membrane semipermeabili. Le membrane in realtà sono ampiamente studiate da vari decenni e da oltre 35 anni vengono usate per il monitoraggio in tempo reale di composti volatili.

Il punto di forza delle membrane è la *permeoselettività* ossia la loro capacità di permettere il passaggio di determinati analiti e, selettivamente, di impedirlo ad altri (37). Posizionando un materiale con queste caratteristiche come parte di un capillare esposta al campione da un lato, e ad un flusso di fluido affine agli analiti, chiamato fase *accettrice* (*acceptor phase*, AP), dall'altro, è possibile estrarre solo le molecole con le determinate caratteristiche con anche un'elevata pre-concentrazione. Le membrane cave di questo tipo sono definite come *Hollow Fiber Membrane* (HFM) (38). La fase accettrice può essere sia un solvente liquido che un gas, in base alle caratteristiche dei composti investigati e del detector utilizzato. Il flusso arricchito degli analiti viene quindi direzionato al detector per una misurazione del segnale in tempo reale. Ottimi detector da accoppiare a strumenti basati sulle membrane semipermeabili sono quelli basati sulla spettrometria di massa; la configurazione che ne consegue, conosciuta col nome di MIMS (*Membrane Introduction Mass Spectrometry*), riesce a dare la necessaria selettività analitica ad analisi in continuo dove gli analiti non sono separati tramite cromatografia e quindi privi di un'informazione caratterizzante come il tempo di ritenzione. Alcuni dei possibili accoppiamenti tra membrane e spettrometri di massa sono riportate in Figura 11. Le membrane attuali possono esser scelte tra diverse varianti di materiali e selettività sterica e permettono l'analisi su matrici gassose, liquide e solide (39).

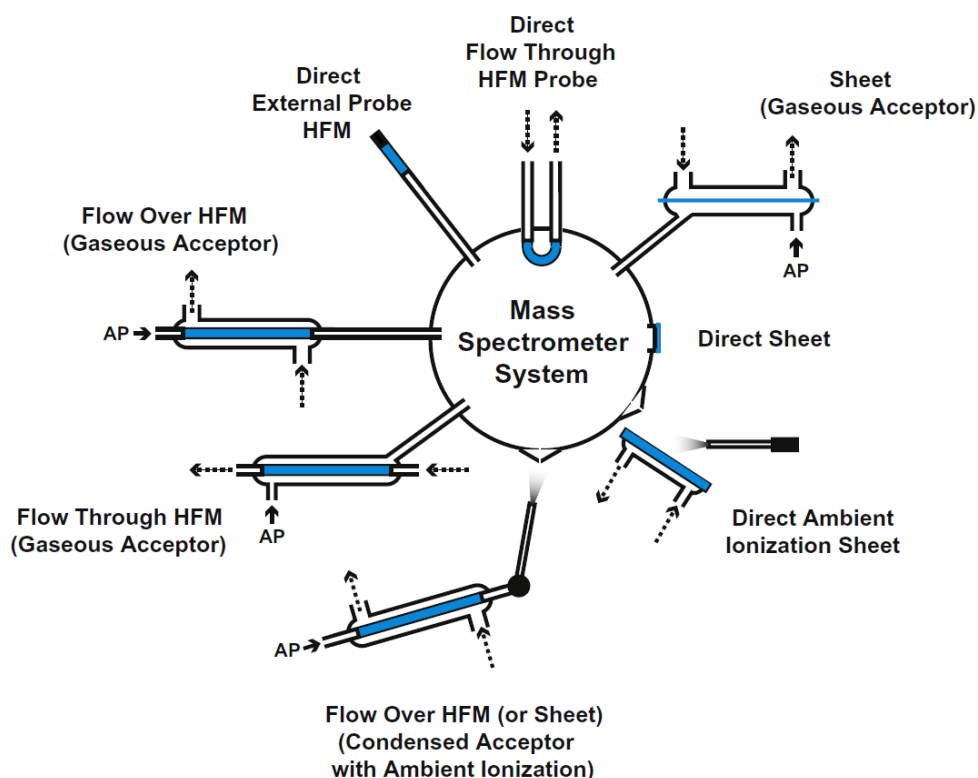


Figura 11. Alcune configurazioni nell'interfacciamento MIMS per campionamenti su gas e su liquidi (40).

Le membrane maggiormente utilizzate in configurazione MIMS sono realizzate in materiali polimerici di sintesi come il polidimetilsilossano (PDMS). Questo materiale è stato ampiamente utilizzato sin dai primi prototipi di membrane, in quanto già ampiamente studiato e conosciuto per la sua stabilità, robustezza e capacità di trasferire selettivamente solo composti idrofobici (41). Il PDMS dà i migliori risultati con composti volatili (storicamente i primi studiati in configurazione MIMS) mentre spesso necessita di modificazioni con i meno volatili. Considerando che uno dei punti di forza delle membrane è la misurazione in tempo reale, risulta evidente che il trasferimento di materia deve avvenire fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico durante il tempo di contatto; per questo motivo i composti altobollenti, ad elevato peso molecolare nonché abbondantemente funzionalizzati da gruppi polari, sono più ostili ad allontanarsi dalla matrice acquosa e richiedono accorgimenti particolari (42). In questi casi una strategia utilizzata con composti volatili e AP gassosa è l'incremento della temperatura; con composti altobollenti e AP temperature troppo elevate possono dare problemi quali la formazione di bolle, il trasferimento di vapore acqueo e la degradazione del materiale. Altri materiali usati per la realizzazione delle membrane sono il Naflon® (38), il Polivinilidenfloruro (44) e tutte le

varianti ottenute andando a modificare il rapporto tra i monomeri costituenti il polimero ed altri parametri strutturali. Un'altra strategia per la misurazione di composti di natura biologica è la possibilità di immobilizzare degli enzimi sulle superficie esterna della membrana in modo da trasformare analiti non permeabili in prodotti permeabili e quindi rilevabili (45).

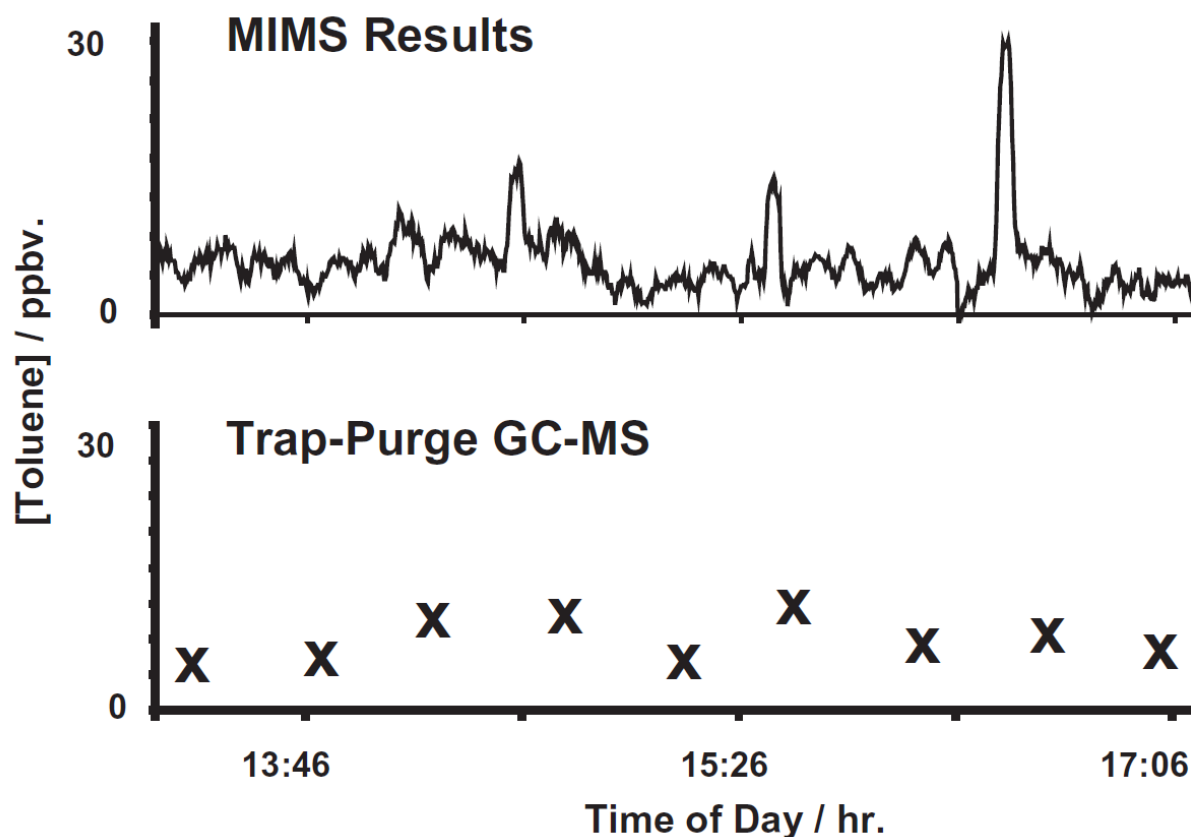


Figura 12. Comparazione tra una tecnica di campionamento/preparativa discontinua come il Purge and Trap ed una in tempo reale come l'accoppiata membrane-spettrometria di massa nel monitoraggio di toluene in tracce nell'atmosfera. Emerge chiaramente come con le membrane sia possibile registrare tutte le informazioni e dare una caratterizzazione molto più accurata (40).

Oggi le membrane sono una delle migliori tecniche per l'analisi di composti target in grado di soddisfare i requisiti della GAC in quanto permettono di evitare i due step tipici di molti protocolli a più elevato impatto ambientale, preparativa e cromatografia (40). La capacità di misurare il segnale analitico in maniera diretta e continua garantisce un'incrementata risoluzione temporale rispetto alle tecniche a monitoraggio discreto e quindi riesce a dare maggiori informazioni (Figura 12). Strumenti basati sulle MIMS sono ottimi per monitoraggi

ambientali in situ, riducendo drasticamente il tempo di maneggiamento del campione e la possibilità di errori; la loro diffusione in questo senso è stata ostacolata dalle dimensioni (e costo) dell'apparecchiatura completa. Oggi, la riduzione delle quantità impiegate nel processo analitico richieste dalla GAC ha determinato una miniaturizzazione anche delle strumentazioni, le quali hanno dimensioni compatibili a quelle di un device portatile.

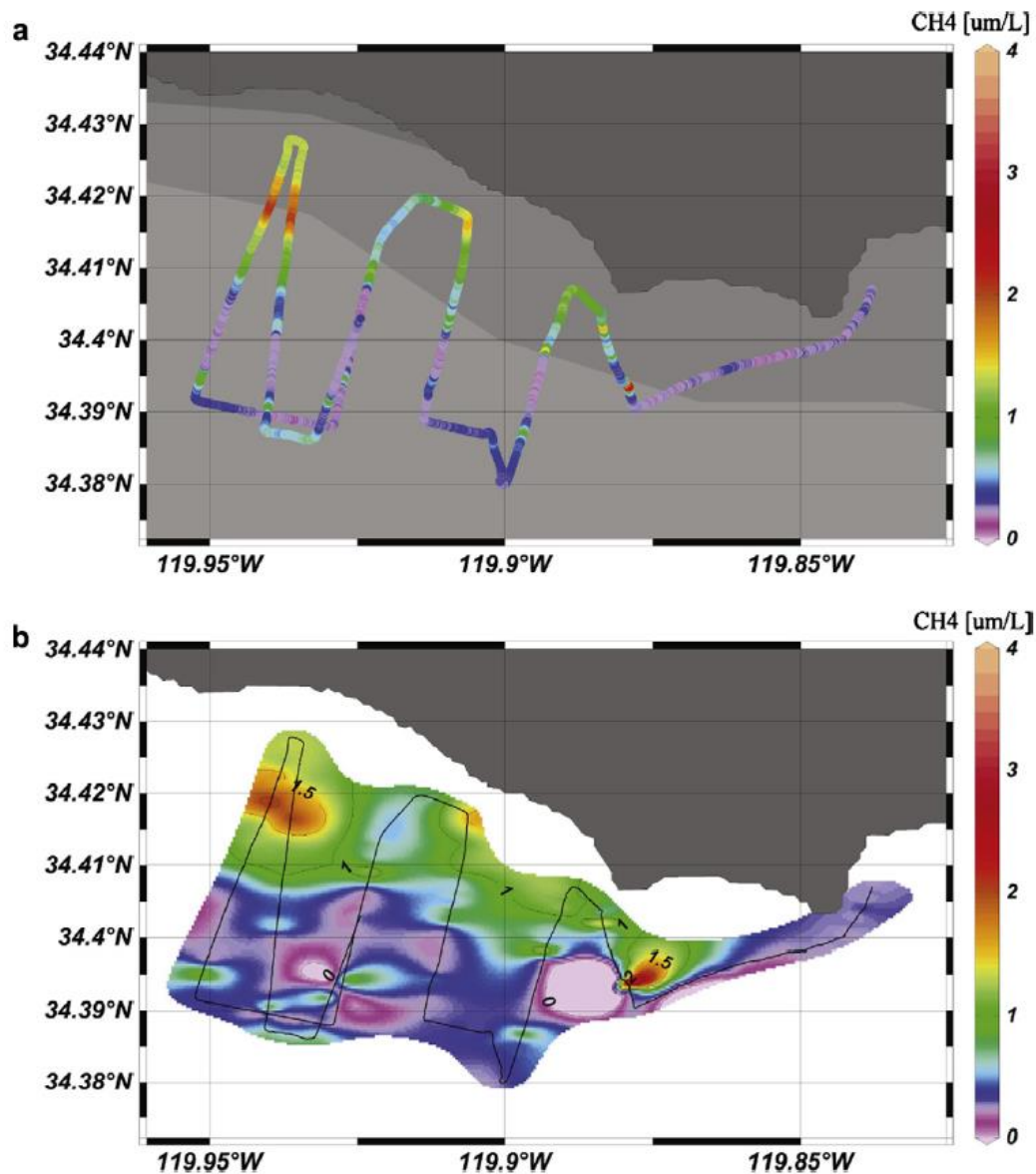


Figura 13. Caratterizzazione della quantità di metano superficiale in un fiume sotterraneo nel canale di Santa Barbara (California, USA) misurata con un sistema MIMS-EI (40).

Utilizzando sistemi MIMS è possibile caratterizzare nel dettaglio varie matrici ambientali di qualsiasi tipo come aria, mare, corsi d'acqua e falde sotterranee (Figura 13). Le loro caratteristiche li rendono perfetti per il monitoraggio di reazioni chimiche e l'ottimizzazione

in itinere delle condizioni operative. Vari tentativi sono stati fatti su sistemi biologici e su reazioni organiche ma i risultati ottenuti sono limitati a composti volatili (per accoppiamenti con AP gassose) o prodotti di idrolisi enzimatica. Per il monitoraggio on-line di reazioni chimiche di composti non volatili sono necessarie tecniche di ionizzazione in fase liquida efficienti e prive di effetto matrice come la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica (EI-MS). Questa sorgente, per quanto altamente prestazionale per un'applicazione di questo tipo, non viene impiegata in quanto operante in condizioni di alto vuoto e con molecole gassose. Per poterla impiegare con AP liquide è necessario l'impiego di apposite interfacce EI-MS, tematica di ricerca che verrà approfondita in seguito.

METODI DI SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

La cromatografia è una tecnica di separazione degli analiti presenti in una miscela omogenea fatti passare attraverso un supporto con il quale instaurano interazioni di differente entità. La diversa affinità dei vari composti per le due fasi, una fissa (stazionaria) ed una corrente (mobile) fa sì che questi oppongano una diversa “resistenza” all’avanzamento (46). Ne consegue che i vari composti usciranno dalla fase stazionaria con un ritardo direttamente proporzionale alle interazioni instaurate; questa differenza è il *tempo di ritenzione*.

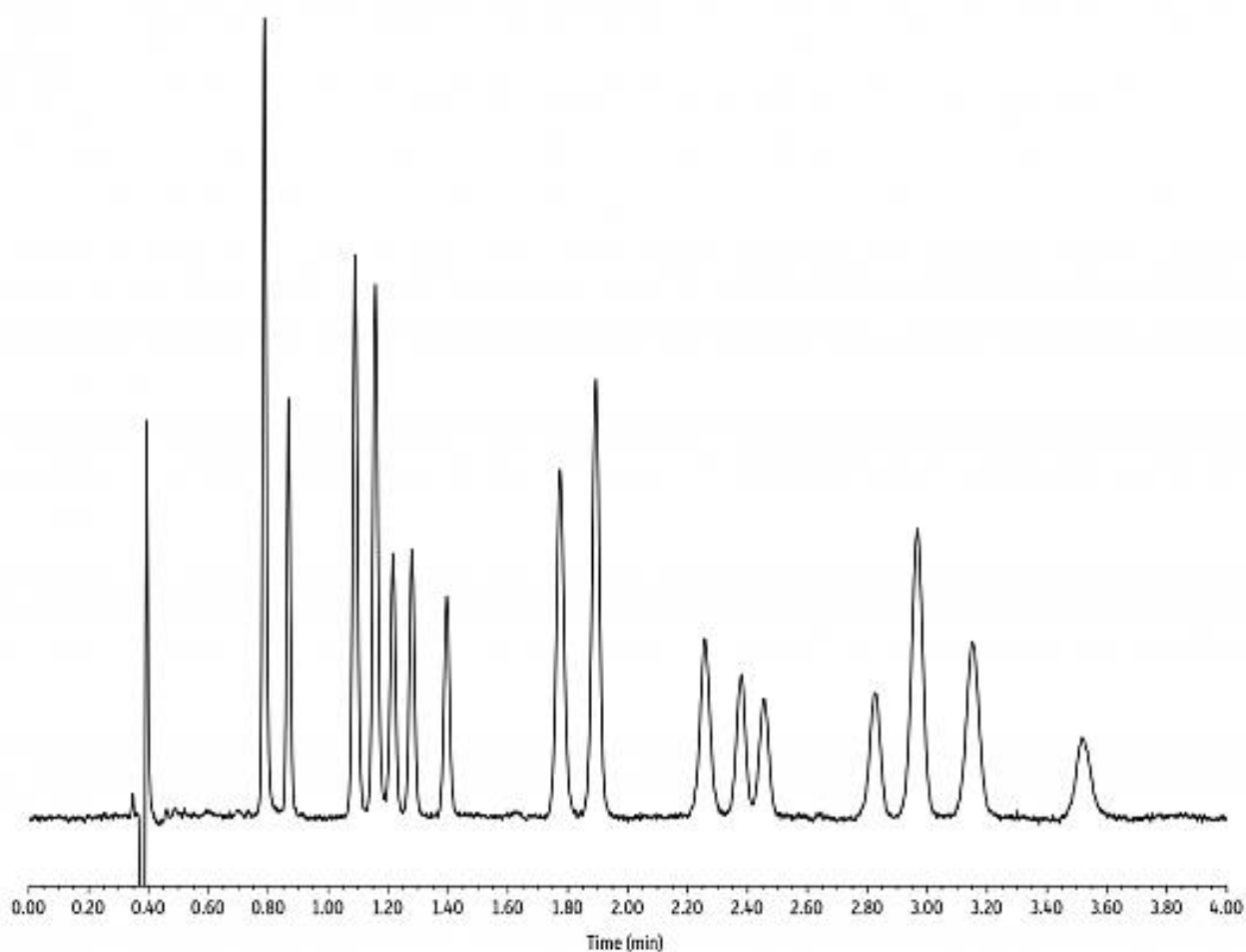


Figura 14. Cromatogramma UHPLC – UV di una miscela standard di 16 cannabinoidi con colonna Restek ARC-18® (47). I composti separati sono (in ordine di eluzione): Cannabidivarinic acid (CBDVA), Cannabidivarin (CBD), Cannabidiolic acid (CBDA), Cannabigerolic acid (CBGA), Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA), Cannabinol (CBN), Cannabinolic acid (CBNA), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Cannabicyclol (CBL), Cannabichromene (CBC), Tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), Cannabichromenic acid (CBCA).

Il risultato di una separazione cromatografica è riportato in un grafico definito *cromatogramma* che associa al tempo (ascissa) il segnale degli analiti (ordinata). Un esempio di cromatogramma è riportato in Figura 14. Parlando genericamente di cromatografia, infatti, si intende sia la tecnica di purificazione di composti tipica della chimica organica, che il processo di separazione del campione usato in campo analitico. Siccome anche in questo passaggio nessun segnale correlabile agli analiti viene acquisito, è ragionevole pensare alla cromatografia come alla parte finale della preparativa. La fase stazionaria è raccolta all'interno di un cilindro di vario diametro e lunghezza definito colonna; qui avviene il contatto tra fasi e si ha la separazione. Le interazioni instaurate tra composti e fase stazionaria variano in base alle loro differenti dimensioni ed all'affinità chimica degli uni per l'altra (principalmente forze di coesione dovute alla diversa polarità ma anche interazioni di carattere elettrostatico come le π tipiche degli anelli aromatici). Il primo esperimento di cromatografia mai realizzato viene attribuito al botanico italo-russo *Michail Semënovič Cvet* (erroneamente trascritto come *Tswett*) il quale separò una miscela di pigmenti naturali usando una fase stazionaria composta da carbonato di calcio ed una fase mobile basata su una miscela di etanolo ed etere di petrolio; è per questo che il nome della tecnica è una traslitterazione della parola greca "*khrôma*" (colore) (48).

La cromatografia come tecnica analitica strumentale, invece, ha avuto origine negli anni 40 in concomitanza con l'emergere della *cromatografia di ripartizione* e della *teoria dei piatti* da parte di Martin e Synge nel 1941 (49). Secondo la suddetta teoria, la colonna cromatografica può essere approssimata ad una colonna per la distillazione di liquidi ovvero suddivisa in stadi di equilibrio tra le fasi chiamati *piatti*; mentre nella distillazione la fase vapore è in equilibrio col proprio liquido, nella colonna la fase mobile è in equilibrio con quella stazionaria. Quanti più stadi di equilibrio sono presenti quanto più efficiente è la separazione quindi, per avere ottime prestazioni con colonne di lunghezza ragionevole, sono necessari piatti "bassi"; da qui la definizione del parametro Altezza Equivalente del Piatto Teorico (*Height Equivalent to a Theoretical Plate, HETP*) con cui si misura la prestazione di una fase stazionaria. Lo sviluppo della cromatografia di ripartizione è valsa per Martin e Synge la vincita del Premio Nobel per la chimica nel 1952 (50). Circa 15 anni dopo, la teoria dei piatti è stata completata da van Deemter con la correlazione tra efficienza cromatografica e velocità lineare della fase mobile (51). La conseguente *rate theory* riassume in un'unica

equazione iperbolica chiamata equazione di van Deemter, gli effetti di tutti i fenomeni fisici, cinetici e termodinamici che interessano la cromatografia.

$$HETP = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Nell'equazione di van Deemter sono presenti vari termini, ognuno rappresentativo di un fenomeno diverso della cromatografia:

- μ è la velocità longitudinale della fase mobile ed è espressa in m .
- A è il parametro che rappresenta l'effetto della presenza di cammini preferenziali dovuti a difetti nell'impaccamento (conosciuto anche come coefficiente di *Eddy*). La presenza di queste imperfezioni non è dovuta alla velocità della fase mobile, quindi il suo valore è espresso in m .
- B è il coefficiente di diffusione longitudinale ovvero nel senso della corrente di fase mobile. Logicamente la sua incidenza è maggiore a basse velocità, quindi lo si trova inversamente proporzionale alla velocità della fase mobile ed espresso come m^2s^{-1} .
- C è la "resistenza" al trasferimento di materia, ossia l'effetto del mancato raggiungimento dell'equilibrio termodinamico tra le due fasi. La sua incidenza è ovviamente maggiore con flussi veloci quindi viene correlato linearmente alla velocità ed espresso come s .

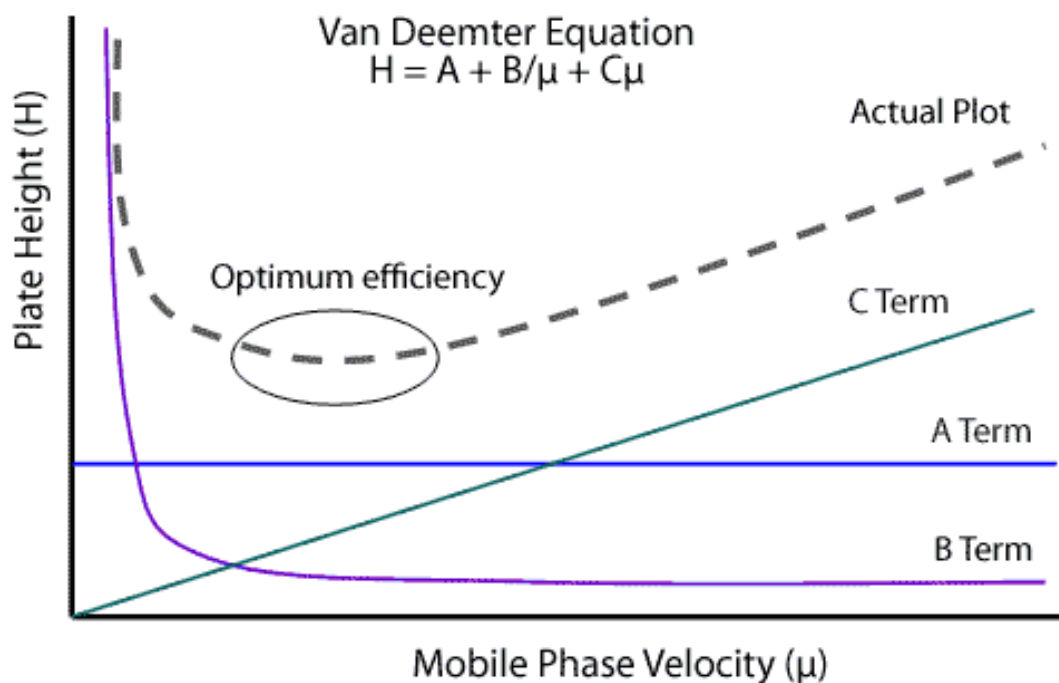


Figura 15. Grafico riportante l'equazione di van Deemter e le equazioni dei singoli contributi. A, B e C (52).

Questa equazione, caratteristica di ogni colonna con determinata geometria e fase stazionaria, tende asintoticamente a HETP infinito per v che tende a zero ed ha infinito, mentre ha un valore di v per il quale HETP raggiunge il minimo e rappresenta il flusso di massima efficienza (Figura 15). L'equazione di van Deemter è stata raffinata nel corso degli anni andando ad aggiungere termini correttivi in grado di massimizzarne l'accuratezza ma la struttura teorica è rimasta la stessa ed è, ad oggi, il modello di riferimento.

Dal punto di vista pratico è possibile calcolare l'altezza del piatto reale H come rapporto tra la lunghezza della colonna L ed il numero di piatti N .

$$H = \frac{L}{N}$$

A sua volta vi sono vari modi di calcolare il numero di piatti andando a sfruttare le caratteristiche del picco gaussiano di un composto noto; una delle più usate si basa sul rapporto tra tempo di ritenzione t_R ed ampiezza del picco alla base W_{base} .

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_{base}} \right)^2$$

Altri parametri fondamentali in cromatografia sono il fattore di capacità (k') ed il coefficiente di selettività (α).

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad ; \quad \alpha = \frac{k'_b}{k'_a}$$

Il fattore di capacità k' è un parametro che relaziona il tempo di ritenzioni di un analita col tempo morto t_M , dove quest'ultimo è il tempo di ritenzione per un composto non ritenuto. Il fattore di selettività è il rapporto tra i k' di due composti ed indica, a parità di condizioni cromatografiche, se è possibile separare efficacemente due composti.

In funzione della condizione di fase mobile e della natura degli analiti sono state sviluppate molte varianti di cromatografia in grado di coprire un'ampia gamma di applicazioni. Tra le tipologie più importanti vanno citate:

- *Cromatografia a Esclusione Sterica (SEC)*: Usata per polimeri e macromolecole, gli analiti vengono fatti passare attraverso una fase stazionaria inerte con pori di dimensione compresa in un intervallo ben preciso. I composti escono in ordine di dimensioni decrescenti (53). Se effettuata su gel è conosciuta come *Gel Permeation Chromatography* (GPC) per sostanze solubili in acqua, o *Gel Filtration Chromatography* (GFC) per sostanze non solubili in acqua.
- *Cromatografia ionica (IC)*: Usata per separare ioni dello stesso segno. Il campione interagisce con una fase stazionaria ionizzata che ritiene gli analiti in base alla densità di carica. L'eluizione viene effettuata con una fase mobile a gradiente di forza ionica (54). Richiede la rigenerazione della fase stazionaria tra una corsa e l'altra, oltre all'uso di rivelatori specifici.
- *Gascromatografia (GC)*: Usata per separare molecole volatili. Il campione viene vaporizzato all'interno dell'iniettore posto ad elevata temperatura, e spinto in colonna da una corrente di gas inerte (*carrier gas*). La colonna, composta da un capillare lungo qualche decina di metri la cui superficie interna è ricoperta da un film di fase stazionaria, trattiene le molecole facendole uscire all'aumentare della temperatura in base alla loro volatilità (55). Usata per la chimica organica e ambientale, impiega come rivelatori tipici il FID (*Flame Ionization Detector*), l'ECD (*Electron Capture Detector*) e lo spettrometro di massa a ionizzazione elettronica (EI-MS).
- *Cromatografia liquida (LC)*: Usata per separare campioni in fase liquida a prescindere dal solvente e con ampia gamma di caratteristiche chimico – fisiche degli analiti. La fase stazionaria è composta da particelle con diametro nell'ordine dell'unità di μm e porosità variabile; qui, gli analiti vengono ritenuti in base all'affinità per la fase stazionaria attraverso un gradiente di composizione della fase mobile. La cromatografia liquida si divide in fase normale (fase stazionaria polare e fase mobile apolare) e fase inversa (fase stazionaria apolare e fase mobile polare). Data la robustezza strutturale delle colonne, in LC è possibile lavorare a flussi e pressioni elevate che permettono separazioni veloci e performanti; da qui la sigla HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) usata frequentemente per intendere la cromatografia liquida. I detector per eccellenza sono il rivelatore UV e la spettrometria di massa con sorgenti API (56).

In particolare per la cromatografia liquida, la variante di maggior interesse in questa tesi, importanti passi avanti sono stati fatti verso il rispetto dei principi della GAC. Un sistema

HPLC convenzionale opera a flussi dell'ordine di varie centinaia di $\mu\text{L}/\text{min}$ fino a vari mL/min ; contestualizzando questo consumo su base giornaliera, il volume di scarico supera il litro di liquidi.

Grazie al progredire della tecnologia nuovi sistemi HPLC sono stati sviluppati in grado di dare elevatissime prestazioni anche con flussi dell'ordine delle decine di $\mu\text{L}/\text{min}$ (micro - HPLC), unità di $\mu\text{L}/\text{min}$ (capillary - HPLC) e centinaia di nL/min (nano – HPLC). Una suddivisione di sistemi HPLC in base al flusso operativo è riassunta in Tabella 3.

Categoria	Diametro interno colonna (mm)	Condizioni operative
Preparativa	> 10	> 20 mL/min
Convenzionale	5 – 4	1 – 10 mL/min
Micro	1 – 2	50 – 100 $\mu\text{L}/\text{min}$
Capillare	0.1 – 1	4 – 20 $\mu\text{L}/\text{min}$
Nano	0.025 – 0.1	1 – 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$

Tabella 3. Suddivisione dei sistemi HPLC in base alla scala dimensionale di diametro colonna e flusso operativo.

I sistemi nano - HPLC hanno assunto sempre più rilevanza nel corso degli ultimi anni; questa espansione è stata fortemente sostenuta dallo sviluppo di detector dedicati ad alte prestazioni e dal carattere green dello strumento. Le colonne impiegate, chiamate nano colonne, sono basate su capillari in silice fusa riempiti con la stessa fase stazionare delle colonne per sistemi convenzionali (57); oltre ai vantaggi dal punto di vista della GAC come riduzione di flusso, scarti prodotti e volume di iniezione, il diametro interno di 50 – 100 volte inferiore permette un abbassamento del HETP, una riduzione della banda cromatografica ed un miglioramento del rapporto S/N (58). La relazione tra caratteristiche geometriche della colonna e prestazioni è riassunta dalla seguente formula (59):

$$D = \frac{C_i}{C_{max}} = \frac{[\varepsilon \pi r^2 (1 + k') \sqrt{2\pi L H}]}{V_{inj}}$$

Le sigle riportate in formula indicano:

- ϵ : porosità della fase stazionaria;
- r : raggio interno della colonna;
- k' : fattore di capacità;
- L : lunghezza della colonna;
- H : altezza equivalente del piatto teorico;
- V_{inj} : volume iniettato.

Al netto dei vantaggi sopra citati, la nano – HPLC ha tutta una serie di limiti che le hanno impedito di sostituire i cromatografi a flussi convenzionali. Nelle connessioni tra componenti e tenute possono crearsi piccoli spazi vuoti nei quali la corrente va a depositarsi e rimescolarsi (Figura 16); questi cosiddetti *volumi morti*, se presenti post colonna, determinano un allargamento della banda cromatografica con conseguente perdita di prestazioni.

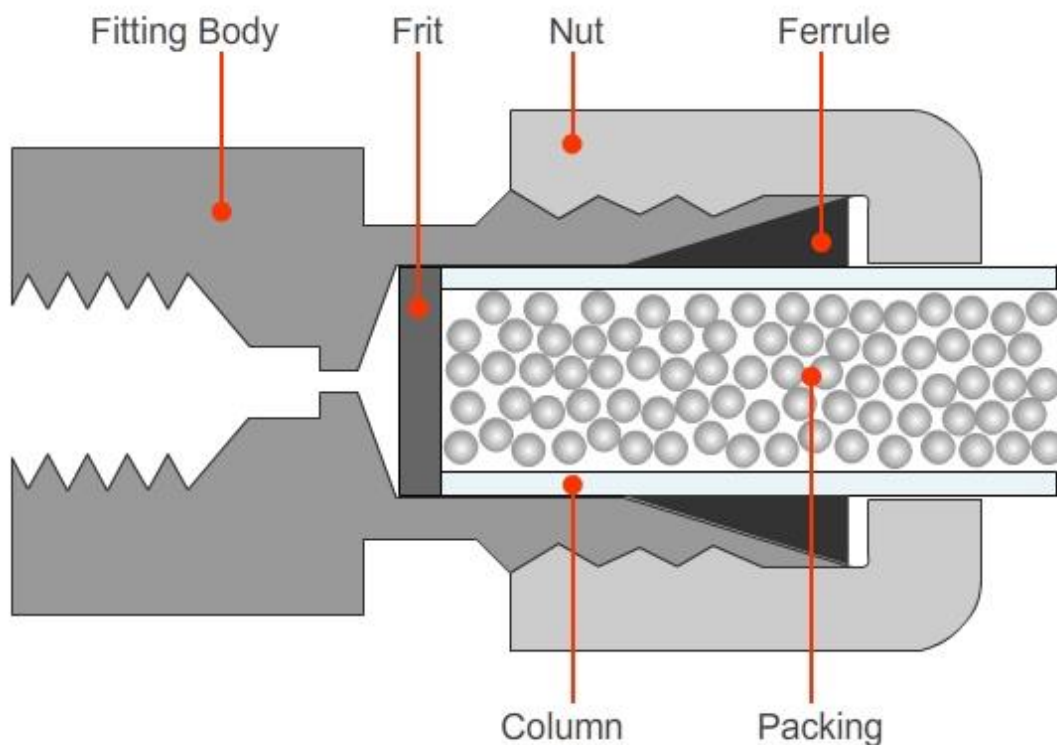


Figura 16. Sezione dell'accoppiamento colonna – capillare dove si vedono i siti in cui potrebbero formarsi volumi morti (60).

L'entità dei volumi morti risulta essere molto più incisiva in sistemi a ridotta portata. La nano – HPLC è globalmente una tecnica meno affidabile dal punto di vista meccanico in quanto la miniaturizzazione dei vari componenti provoca più problemi nel mantenimento delle tenute ed anche le colonne possono facilmente bloccarsi con campioni sporchi (61). Infine, al diminuire della “scala” del cromatografo, il tempo necessario per ottenere la separazione aumenta; nonostante a parità di fase stazionaria l'altezza dei piatti teorici non varia considerevolmente, a causa del diametro interno inferiore operando con la velocità della fase mobile si ottengono contropressioni spesso superiori al massimo consentito. Oggi questo limite è stato in parte arginato dai nano – UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) i quali operano a pressioni superiori a 1000 bar in modo da garantire una velocità del flusso adeguata. Considerate le sue caratteristiche ed il continuo affermarsi delle tecniche ifenate LC-MS, la cromatografia nano – HPLC è risultata essere la perfetta combinazione per le sorgenti ESI nano-electrospray (Figura 17).

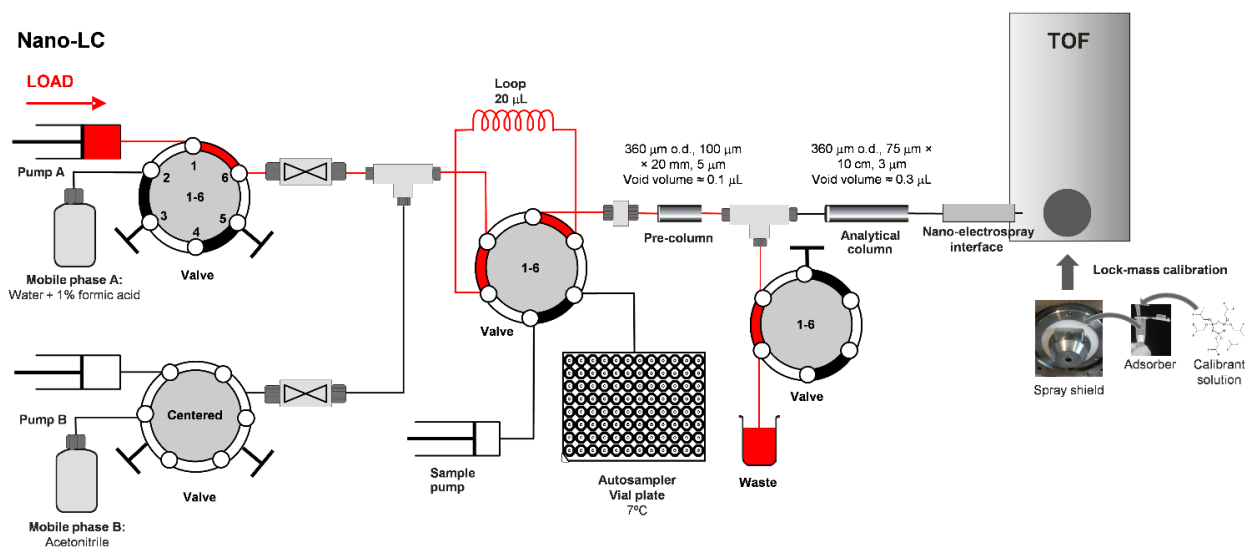


Figura 17. Schema di un sistema nano LC-MS con sorgente nano-electrospray (62).

Allo stato attuale però questa tecnologia resta relegata alle attività di ricerca in quanto inadatta ad analisi di routine.

SISTEMI DI RIVELAZIONE: LA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è da quasi 50 anni la tecnica strumentale di riferimento per l'analisi di molecole organiche e macromolecole biologiche; oggi, la sua evoluzione ne ha esteso l'utilizzo anche per la mappatura della superficie di tessuti (*imaging*) e l'analisi di metalli (ICP-MS). Nella spettrometria di massa gli analiti vengono resi carichi (ioni) ed è quindi misurato il loro rapporto massa/carica (m/z); in caso di energia residua, questa può andare a rompere i legami più deboli in modo da frammentare la struttura dello ione. L'insieme dei segnali derivanti dalla molecola ionizzata e dai suoi frammenti è riassunta in un grafico chiamato spettro di massa, dove nell'asse delle ordinate c'è l'intensità relativa e sull'asse delle ascisse il m/z . Nello spettro di massa l'intensità è espressa come normalizzata sul rapporto m/z più intenso chiamato *picco base*. Lo ione corrispondente alla molecola tale quale è chiamato *ione molecolare* mentre i segnali successivi a rapporti m/z inferiori sono imputabili ai suoi frammenti. Dalla lettura dello spettro è possibile ricavare alcune informazioni strutturali della molecola ionizzata (63). A causa della ionizzazione, gli analiti non possono essere recuperati e quindi la spettrometria di massa è una tecnica distruttiva, diversamente da molte tecniche moderne quali NMR, Raman o IR. Il funzionamento dello spettrometro di massa è basato su una serie di processi comuni riportati in Figura 18.

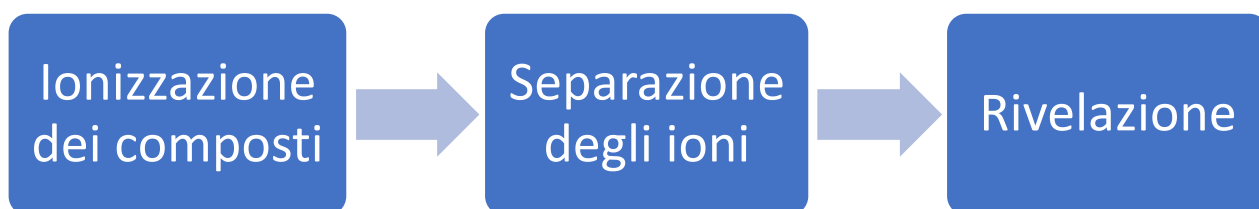


Figura 18. Schema a blocchi riportante i tre passaggi chiave del funzionamento degli spettrometri di massa.

Nella spettrometria di massa le molecole alimentate allo spettrometro vengono trasformate in ioni, ossia vengono dotate di una carica; questo primo passaggio, fa sì che il composto carico risponda alla presenza di campi elettrici e/o magnetici. Questi ioni possono essere basati su atomi, cluster, molecole o frammenti.

LA SORGENTE

Il primo step è quello che avviene nella prima parte dello spettrometro che incontra gli analiti: la *sorgente*. Siccome alcune molecole sono più grandi e pesanti, mentre altre sono più piccole e leggere la densità della carica risulta essere diversa, e con essa la risposta ai campi elettromagnetici esterni. In questa maniera è possibile separare gli ioni nel secondo step, e far giungere al rivelatore isolati ed in maniera indipendente solo gli ioni con un determinato rapporto massa/carica (m/z). La separazione degli ioni avviene nell'*analizzatore* mentre la rivelazione è compito dell'*elettromoltiplicatore*. In tutti gli spettrometri di massa, indipendentemente dal loro tipo, questi tre step avvengono con questa sequenza e i tre componenti sono sempre presenti.

In base alle analisi di destinazione possono essere impiegate diverse sorgenti; questo è il componente più importante dello spettrometro e quello che, più degli altri, ne caratterizza pregi e difetti e delimita i campi di applicazione. Tra le sorgenti principali vanno certamente citate la EI (Electron Ionization o Electron Impact), la CI (Chemical Ionization), l'ESI (Elettrospray Ionization), l'APCI (Atmospheric Pressure Ionization) e la MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization); grazie allo sviluppo tecnologico altre sorgenti sono state messe a punto ma sono rimaste legate ad applicazioni di nicchia e quindi di minor interesse. In questa tesi verranno trattate le due sorgenti di riferimento per "l'ionizzazione" con cromatografia liquida e gassosa ovvero ESI ed EI.

La ionizzazione elettronica EI è una sorgente di riferimento per la chimica organica e la si trova tipicamente abbinata alla gascromatografia. Nella EI un fascio di elettroni ad alta energia bombarda un flusso di gas neutro causando la rimozione di un elettrone e la formazione di uno ione positivo radicalico (64). Gli elettroni vengono prodotti da un filamento posto lateralmente all'uscita del gas proveniente dal GC in modo che il flusso sia obbligato a passarvi attraverso. Questo fenomeno, chiamato *effetto termoionico* avviene con la massima efficienza nel vuoto e quindi tutta la sorgente EI viene mantenuta in condizioni di ridotta pressione ($<10^{-5}$ Torr) da un sistema di pompe da vuoto (65). La "camera" all'interno della quale avviene la ionizzazione è definita *volume ionico*; qui, un dispositivo chiamato repeller, posto perpendicolarmente alla corrente gassosa, applica un intenso campo elettrico ed accelera tutti gli ioni verso l'analizzatore. Le molecole non ionizzate non risentono del

campo applicato dal repeller e quindi proseguono il loro moto linearmente; il sistema di vuoto, dimensionato in modo da poter rimuovere tante molecole quante ne vengono alimentate, aspira questi composti mantenendo la pressione ridotta e costante. La condizione di *vuoto* è fondamentale per impedire che gli ioni e le molecole non ionizzate possano interagire. L'insieme degli ioni accelerati dal repeller passa attraverso un sistema di lenti utili per collimare ed accelerare ulteriormente il fascio verso l'analizzatore.

Uno schema di funzionamento della sorgente EI è riportato in Figura 19.

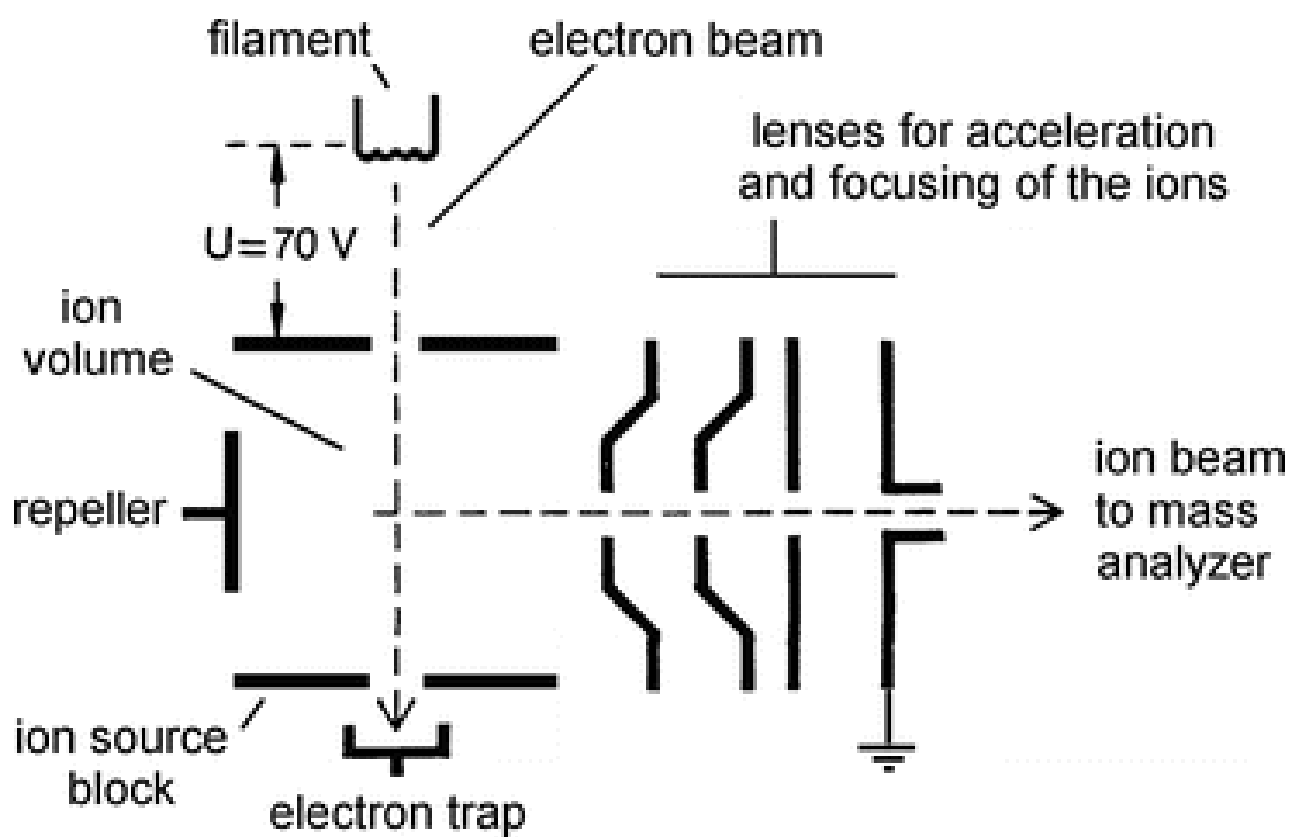


Figura 19. Rappresentazione schematica del funzionamento della sorgente EI (66).

La ionizzazione non è in alcun modo influenzata dalla natura chimica del composto ma dettata esclusivamente dall'interazione tra analita ed elettroni rilasciati dal filamento. La molecola ionizzata aumenta la propria energia destabilizzandosi ed impiega la quantità restante nella rottura di legami, ovviamente partendo dai meno forti. Lo studio dei frammenti formati fornisce informazioni sulla struttura della molecola fornendo un'impronta digitale preziosa nel riconoscimento di composti sconosciuti. L'energia degli elettroni

ionizzanti può essere regolata in modo da ottenere un'abbondante frammentazione con lo ione molecolare poco intenso o viceversa, in modo da enfatizzare l'intensità dello ione molecolare non frammentato. Siccome l'intorno chimico degli analiti non ne influenza il pattern di frammentazione gli spettri di massa di gran parte delle molecole analizzabili in EI sono stati registrati in librerie tra le quali spiccano la NIST, dall'istituto che ne ha curato la creazione ed oggi la diffusione (National Institute of Standards and Technology), e la Wiley. L'energia con cui sono stati ottenuti questi spettri di riferimento è stata 70eV in modo da ottenere il miglior compromesso tra intensità dello ione molecolare e informazioni strutturali, oltre che una maggior corrente ionica totale (*Total Ion Current, TIC*). Un esempio di spettro a 70eV registrato nella NIST è riportato in Figura 20.

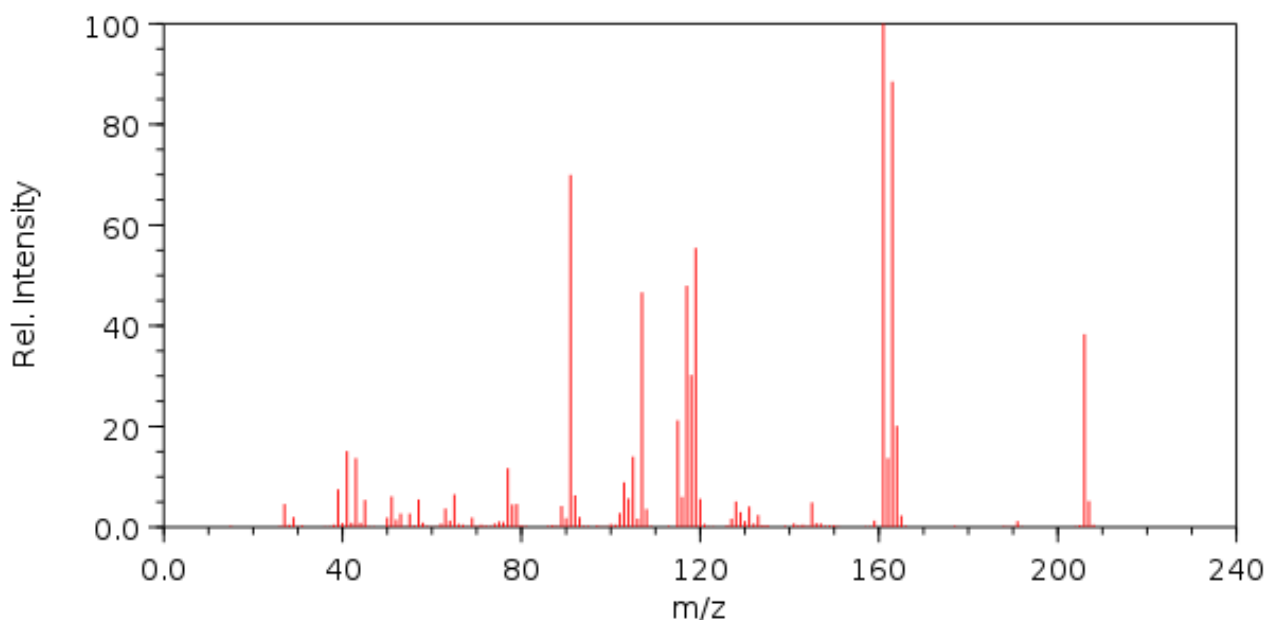


Figura 20. Spettro di massa EI 70eV dell'ibuprofene con tanto di ione molecolare e frammentazioni tipiche (67).

Se la ionizzazione elettronica è la sorgente tipicamente abbinata alla gascromatografia (GC-MS), l'ESI (*Electro Spray Ionization*) è la combinazione convenzionale con la cromatografia liquida (LC-MS). La ionizzazione elettrospray rientra tra le tecniche a bassa energia (soft) ed è la sorgente di ionizzazione a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Ionization, API*) più usata (68). La sua nascita è datata al 1984 per mano di Masamichi Yamashita e John Fenn (69) anche se, fino alla vincita del Premio Nobel di quest'ultimo nel 2002, rimase relegata allo stadio di prototipo (70). La sorgente ESI è basata su un capillare recante la fase liquida

definito *capillare di vaporizzazione*, circondato da un apposito elettrodo cilindrico che vi applica un potenziale elettrostatico di 3-4 kV (71). All'uscita del capillare, grazie al potenziale applicato ed alla ridotta sezione, il liquido si trasforma in un aerosol di fini particelle liquide cariche elettricamente; questo spray di liquido indotto dall'applicazione di una differenza di potenziale (è questo passaggio il vero *elettrospray*), è un fenomeno conosciuto come *cono di Taylor*, dal cognome del fisico inglese che ne portò avanti gli studi (72). Nel cono di Taylor un liquido ad elevata forza ionica espulso da un ugello sottoposto a potenziale forma uno spray conico le cui goccioline vanno gradualmente perdendo molecole di solvente; il processo procede fino al raggiungimento di un raggio critico o di Rayleigh, valore nel quale avviene l'esplosione o fissione coulombiana e gli ioni vengono espulsi dal liquido (73). Tutto il processo è riportato in Figura 21.

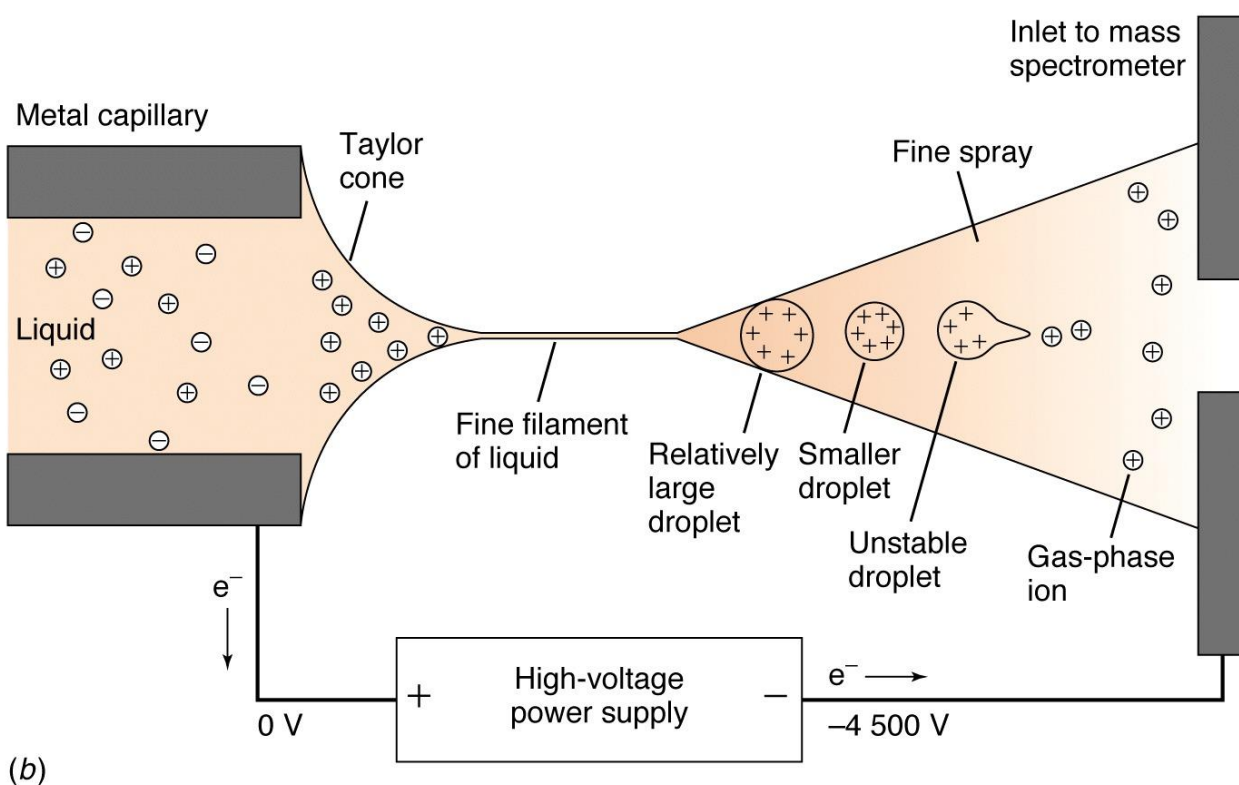


Figura 21. Evoluzione dell'elettrospray degli ioni della fase liquida all'interno della sorgente (60).

L'insieme di ioni e micro gocce entra, tramite un capillare di trasferimento, all'interno di un primo stadio di vuoto, propedeutico ad un secondo stadio di vuoto, dove è posizionato l'analizzatore; le gocce di liquido che non hanno terminato il processo di ionizzazione vengono schermate da uno skimmer posto tra la prima e la seconda camera a bassa

pressione (74). Anche tra ugello e skimmer viene applicata una differenza di potenziale in modo da ultimare la desolvatazione dalle gocce che vi si condensano ed ottenere una ulteriore frammentazione tramite collisione di ioni già formati (Collisionally Induced Dissociation, CID). Questa frammentazione è conosciuta come Nozzle-Skimmer Dissociation (75). Come per l'EI, la condizione di *vuoto* è fondamentale agli ioni formati per garantire la massima distanza con altre molecole in fase gas con cui essi possono interagire (76). Un esempio di sorgente ESI completa dei tre step a pressione decrescente è riportato in Figura 22.

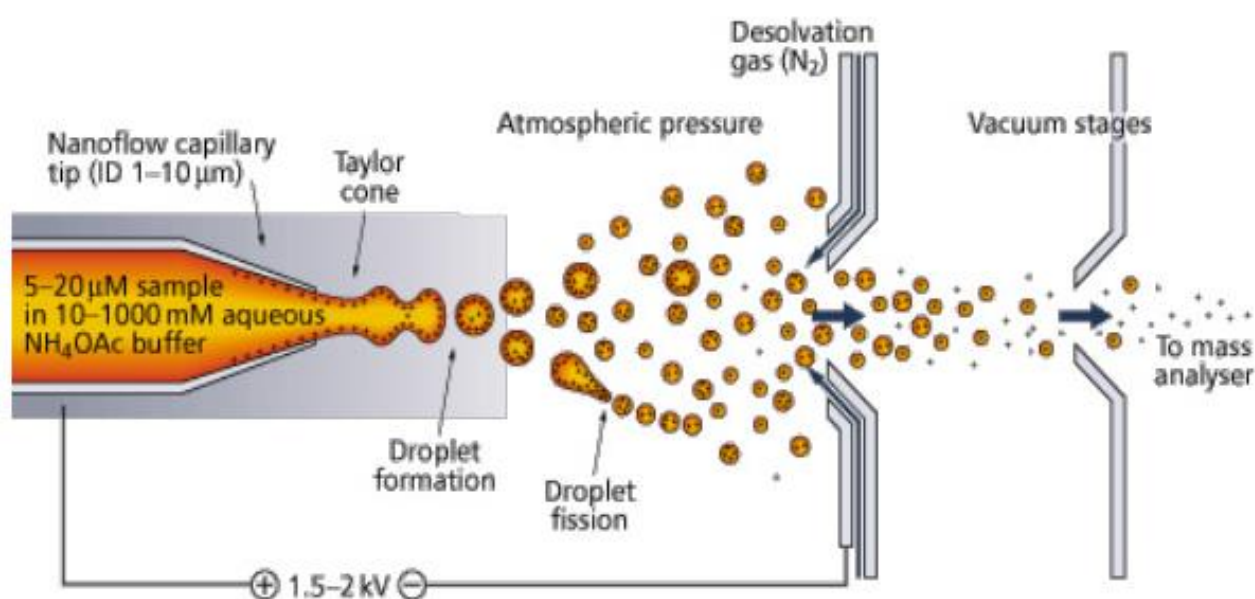


Figura 22. Schema di una sorgente ESI completa di uno spettrometro Thermo Scientific® (77).

Diversamente dalla EI, la sorgente ESI è una sorgente non-ionizzante; gli ioni infatti sono presenti già nella soluzione e l'analita diventa carico a seguito di equilibrio acido – base o di scambio ionico. Inoltre, l'intero processo avviene a pressione atmosferica in quanto solo una volta avvenuto l'elettrospray gli ioni incontrano condizioni di bassa pressione. Ovviamente per ottenere la formazione del cono di Taylor è fondamentale la presenza di ioni, indipendentemente dalla loro natura, all'interno del liquido. Volendo sfruttare questo fenomeno nelle sorgenti elettrospray si usano acidi per protonare analiti basici, e basi per dissociare i siti acidi dei composti di interesse; ovviamente gli ioni creati con queste due strategie antitetiche sono di carattere opposto ma parimenti valide. Per stabilizzare il

carattere acido/basico della matrice, nelle procedure con analisi ESI si lavora in presenza di tamponi i quali rendono il pH costante e regolarizzano gli equilibri tra forme dissociate e neutre (78). Ioni generati dall'aggiunta di ioni provenienti dalla dissociazione di sali inorganici sono altrettanto efficaci. Siccome in molecole poli-funzionalizzate ci possono essere più siti basici e/o più protoni acidi, nella ionizzazione ESI è comune la formazione di ioni multicarica (79); questo aspetto è particolarmente vantaggioso per ridurre il rapporto m/z di composti ad elevata massa molecolare e permettere l'uso di analizzatori con un limite massimo di massa/carica.

Dal punto di vista termodinamico, il passaggio di stato da liquido a vapore del solvente è un processo endotermico che quindi prevede l'assorbimento di energia termica dall'ambiente. Le condizioni operative dell'elettrospray sono definibili come adiabatiche, quindi la transizione determina una riduzione della temperatura con conseguente rischio di solidificazione della fase mobile. Per superare questa problematica, un flusso di gas inerte riscaldato (solitamente azoto) viene fatto passare nella parte a pressione atmosferica della sorgente in modo da fornire l'entalpia necessaria all'evaporazione del liquido (80).

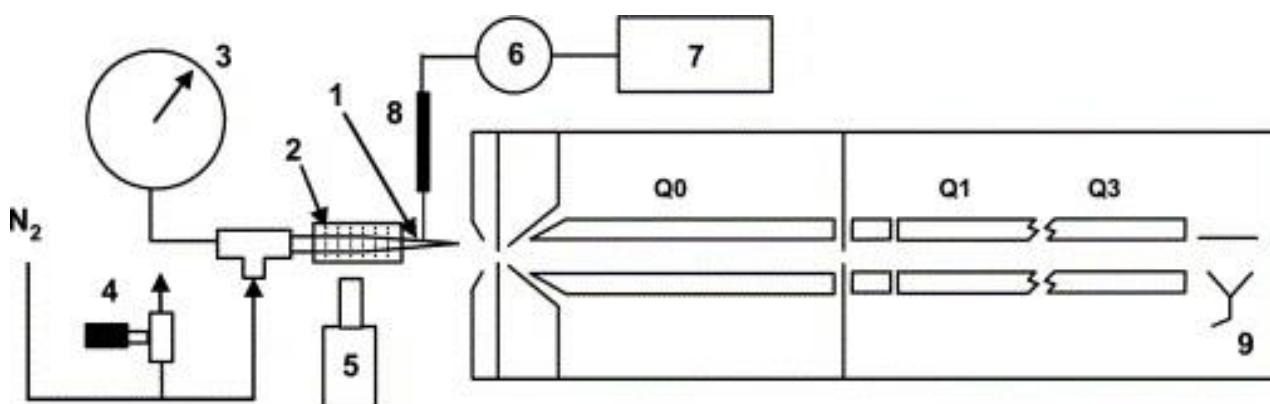


Figura 23. Schema di una sorgente nano – ESI (81); evidente la forte somiglianza con l'ESI convenzionale. 1 – Ago nano elettrospray; 2 – Griglia; 3 – Valvola di pressione; 4 – Valvola a spillo per il controllo della contropressione; 5 – Videocamera; 6- Pico-amperometro per la misura della corrente nell'ago; 7 – Alimentazione ad elevato voltaggio; 8 – Resistenza da 10GΩ; 9 – Elettromoltiplicatore.

I flussi operativi per il corretto funzionamento della sorgente ESI sono compresi tra 1000 e 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, valori tipici dei sistemi LC convenzionali e micro. Valori maggiori possono essere adattati attraverso lo splittaggio di parte del flusso in ingresso; i principi della GAC però richiedono la riduzione del consumo di fase mobile e, quindi, del flusso operativo dei

cromatografi. Per questa ed altre ragioni, il processo di miniaturizzazione avvenuto per i sistemi di separazione ha riguardato anche gli spettrometri elettrospray. La *nanoelectrospray* è una versione dell'ESI su scala ridotta; il suo funzionamento è basato sui medesimi principi ma i componenti interni sono miniaturizzati (Figura 23).

L'ago del nebulizzatore viene sostituito da un capillare di vetro borosilicato di pochi microlitri la cui punta viene resa conica con foro da 1 – 4 μm utilizzando la stessa procedura delle pipette Pasteur. La nano ESI permette l'uso dello spettrometro con cromatografi nano – LC operanti a partire da 20 nL/min e produce gocce dal diametro di 200 nm, 100 – 1000 volte più piccole degli ESI convenzionali. In queste condizioni l'evaporazione del solvente è più veloce ed efficace oltre a rendere la ionizzazione efficace anche con solventi ad alta polarità come l'acqua ed anche in presenza di concentrazioni di tampone più elevate (81). Grazie a questi vantaggi, oltre alle elevate prestazioni analitiche con volumi di iniezione nano, i sistemi nano ESI stanno incrementando la propria diffusione e, con essa, anche quella dei cromatografi nano – LC.

L'ANALIZZATORE

L'analizzatore è il componente che segue la sorgente nel processo strumentale e che ha il compito di separare gli ioni che lo attraversano in base al loro rapporto m/z ; il suo ruolo è fondamentale in quanto rende interpretabile il risultato della ionizzazione (82).

L'analizzatore può operare in due modi:

- *Scan*: viene eseguita una scansione in un intervallo definito di rapporti m/z e viene acquisito il segnale (o corrente) per ognuno di loro. Questa modalità registra molte informazioni ed è quindi assolutamente la più performante nell'analisi di composti *untargeted*. Assieme al segnale degli analiti vengono registrati anche i segnali di composti della matrice e, soprattutto, il rumore, rendendo lo scan un'acquisizione con pessimi limiti LOD e LOQ ed inadatta alla quantificazione (83).
- *Selected Ion Monitoring (SIM)*: l'analizzatore viene focalizzato solo su precisi rapporti m/z e la corrente prodotta è dovuta esclusivamente a questi ioni (84). Il rumore è drasticamente più basso rispetto allo scan in quanto dovuto esclusivamente a *thermal noise* e *flicker noise* ovvero a qualcosa di inevitabilmente presente. Operando in SIM le molecole possono essere riconosciute dalla combinazione dei segnali di almeno tre m/z caratteristici nelle previste intensità relative e del tempo di ritenzione. Questa strategia si è dimostrata valida con molecole piccole e piuttosto semplici, mentre con macromolecole o polimeri in matrici complesse spesso si è rivelata poco affidabile. Comunque rispetto allo scan, l'acquisizione SIM è preferibile nella quantificazione e nell'approccio *targeted* (85).

Agli albori della spettrometria di massa l'analizzatore più usato era il *settore magnetico* o *analizzatore a singola focalizzazione* (86). Questi componenti, oggi non più in produzione, separano gli ioni all'interno di un campo magnetico sulla base della diversa curvatura nella traiettoria percorsa. Le prestazioni in termini velocità di scansione e di risoluzione sono decisamente modeste; la variante a *doppia focalizzazione*, ovvero dotata anche di un settore elettrostatico, permette una risoluzione superiore anche se non in linea con quanto offerto oggi dalla tecnologia (87). Anche nell'analizzatore, come in ogni parte nel quale sono presenti ioni, è fondamentale l'alto vuoto. Un esempio di settore magnetico è riportato in Figura 24.

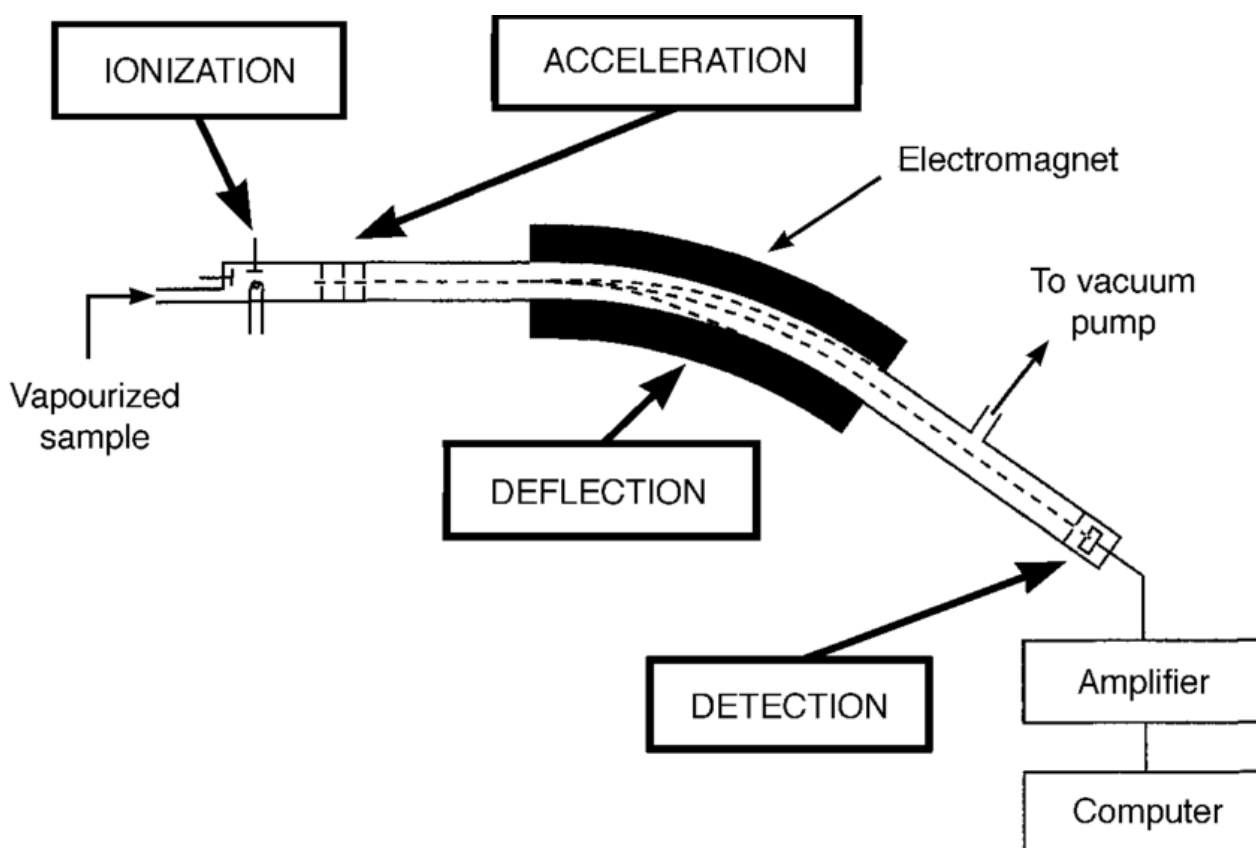


Figura 24. Esempio di spettrometro di massa a settore magnetico; importante notare la presenza del vuoto anche nell'analizzatore (88).

Negli strumenti attuali gli analizzatori a settore magnetico o elettromagnetico sono stati sostituiti principalmente dai quadrupoli (89), dalle trappole ioniche (*Ion Trap*, *Orbitrap*, *Linear Ion Trap*) (90), dal tempo di volo (*Time of Flight*, *TOF*) (91) e dagli analizzatori a risonanza ciclotronica a trasformata di Fourier (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, *FT-ICR*) (92). Questi analizzatori, operanti tutti in vuoto, possono essere utilizzati con tutte le sorgenti disponibili, indifferentemente dal tipo di ionizzazione; va comunque ricordato che alcune combinazioni sono più comuni e performanti di altre (es. MALDI – TOF, EI – Quadrupolo). Inoltre possono anche essere combinati in successione per esperimenti di massa *tandem* in modo da poter massimizzare le prestazioni analitiche quali sensibilità e risoluzione spettrometrica (93). Coerentemente con l'analizzatore utilizzato negli esperimenti presentati in questa tesi di dottorato, solo il quadrupolo sarà oggetto di approfondimento.

Il quadrupolo è indubbiamente l'analizzatore oggi più diffuso negli spettrometri di massa; per capirne la rilevanza basti pensare che il suo impiego in spettrometria è valso a Paul Wolfgang la vincita del Premio Nobel per la Fisica nel 1990 (94). Il quadrupolo è il miglior analizzatore per la GC-MS in quanto garantisce la miglior velocità di scansione, prestazione fondamentale nella registrazione degli spettri EI anche se a discapito della risoluzione. In LC-MS invece, i quadrupoli sono dispositivi standard da usare come primo analizzatore per esperimenti MS/MS grazie alla loro robustezza, economicità e stabilità di risposta. I moderni quadrupoli raggiungono valori di m/z superiori a 2000 con risoluzione unitaria in tutto il range operativo, risultano affidabili e compatti garantendo elevata trasmissione e bassi voltaggi di accelerazione.

Il quadrupolo è composto da quattro elettrodi a barra di forma iperbolica o cilindrica disposti longitudinalmente e montati in configurazione a quadrato (Figura 25); le coppie di barre opposte sono mantenute allo stesso voltaggio, composto a sua volta da una corrente continua (DC) ed una alternata (AC). Quando uno ione entra nel volume compreso tra le quattro barre, su di esso risulta una carica attrattiva verso gli elettrodi a segno opposto della sua carica. Se il voltaggio fosse periodico, attrazione e repulsione si alternerebbero nel tempo; siccome il potenziale è sia continuo che alternato a radiofrequenza RF, il campo periodico non è omogeneo ed una forza media verso una delle barre è sempre presente. In questi casi la sola possibilità di attraversare il quadrupolo senza collidere con gli elettrodi è il passaggio dello ione al centro, nella traiettoria longitudinale equidistante dalle barre dove il campo magnetico risultante è nullo. Le condizioni da soddisfare per permettere l'attraversamento del quadrupolo allo ione sono riassunte nell'equazione di Mathieu (95). Per ogni combinazione di DC, AC e ω esiste un solo rapporto m/z per cui uno ione può attraversare il quadrupolo senza andare a scaricarsi su una delle barre. L'equazione di Mathieu è in realtà ben più complessa ed articolata di quanto descritto sopra; per quanto riguarda i fini di questa tesi, approfondire la teoria legata ai quadrupoli sarebbe pleonastico.

Il quadrupolo è un analizzatore a bassa risoluzione in quanto in grado di misurare la massa *nominale* degli ioni; i principali limiti per questo parametro sono l'accuratezza realizzativa (le barre sono allineate a ben $\pm 10 \mu\text{m}$ nel migliore dei casi, un grado di imprecisione elevato), la ridotta lunghezza ed il profilo rettilineo delle barre piuttosto che iperbolico (il campo magnetico ha profilo iperbolico). Negli strumenti attuali è installato un sistema di passaggi

multipli in cui gli ioni in uscita dal quadrupolo possono essere riflessi di nuovo all'interno dello stesso in modo da aumentare i cicli di RF.

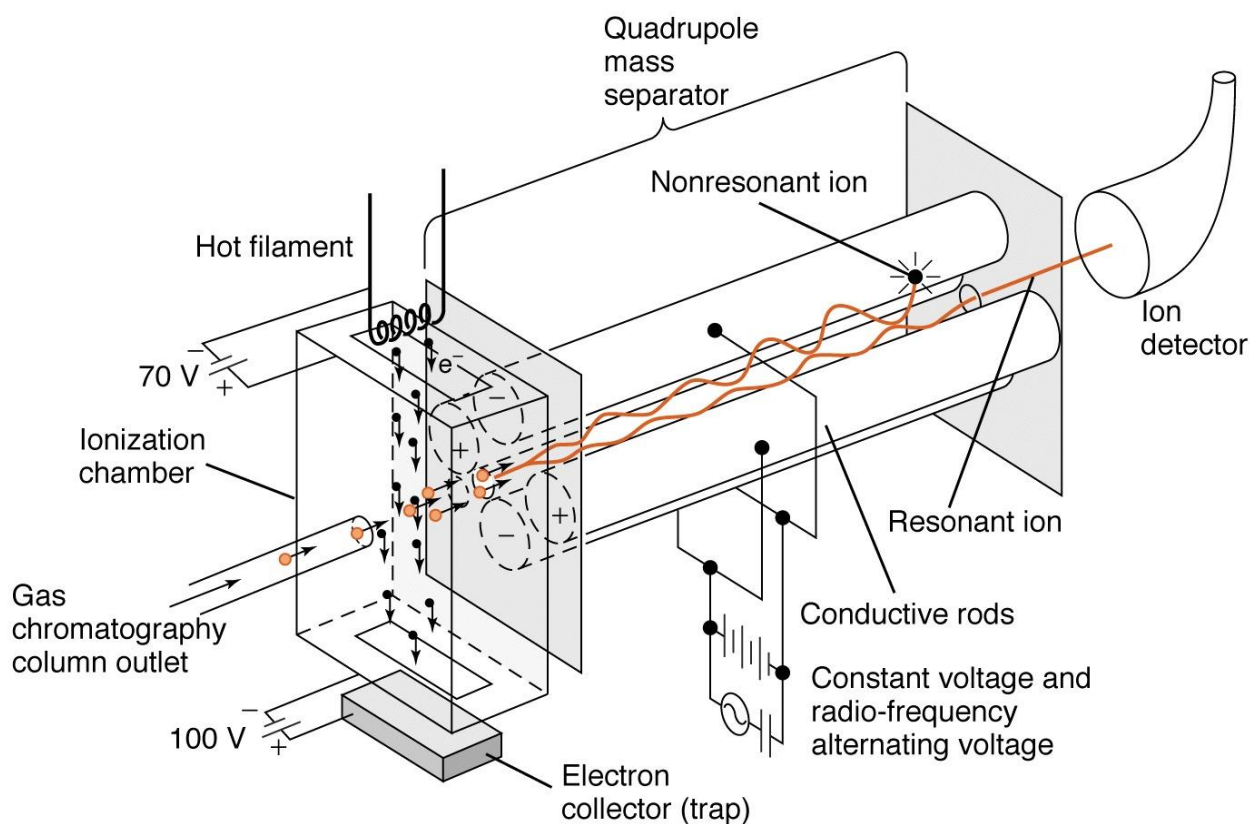


Figura 25. Spaccato di un analizzatore a quadrupolo con dettaglio della traiettoria degli ioni che lo attraversano.

Numerose varianti del quadrupolo sono state presentate e commercializzate; ciononostante, l'aumento della complessità costruttiva e dei costi di esapoli o ottapoli (ovvero analizzatori a sei ed otto elettrodi) non garantisce vantaggi tangibili nella separazione degli ioni. Discorso diverso va fatto per gli spettrometri di massa ibridi, ovvero in grado di fare esperimenti di massa tandem; qui esapoli ed ottapoli sono spesso usati come celle di collisione tra il primo ed il secondo analizzatore. Il quadrupolo può essere usato con successo anche come trappola ionica lineare (*Linear Ion Trap, LIT*) andando a generare un crollo del potenziale all'interno dell'analizzatore che, di fatto, intrappola lo ione; queste tipologie di multipolo non verranno trattate in questa sede (96).

IL RIVELATORE

Il rivelatore è il componente finale dello spettrometro di massa che ha il compito di convertire il flusso di ioni, prodotto nella sorgente e separato nell'analizzatore, in un segnale elettrico interpretabile. Dal rivelatore esce una corrente dovuta allo ione o all'insieme di ioni che vi vanno a interagire, chiamata corrente ionica totale (*Total Ion Current, TIC*).

Nonostante svolga un ruolo fondamentale questo componente ha rilevanza minima sulle prestazioni dello strumento in quanto la sua affidabilità e velocità di risposta sono ampiamente maggiori dei due componenti precedenti. Inizialmente il primo rivelatore è stato la *tazza di Faraday*, ovvero un elettrodo nel quale gli ioni vanno a scaricarsi generando un voltaggio misurabile. Negli strumenti moderni vengono utilizzati *moltiplicatore di elettroni secondari* (*Secondary Electrons Multiplier, SEM*), ovvero sistemi in grado di rilasciare elettroni secondari all'impatto dello ione amplificando il segnale prodotto (97). Tra i vari SEM merita menzione il *channeltron*, ovvero un dinodo continuo realizzato a forma di tubo che produce una cascata di ioni secondari secondo i principi di cui sopra. Il guadagno del segnale rivelato dal channeltron, in particolare per la versione curva, raggiunge 10^8 . Un esempio di come questo rivelatore sia fatto è riportato in Figura 26.

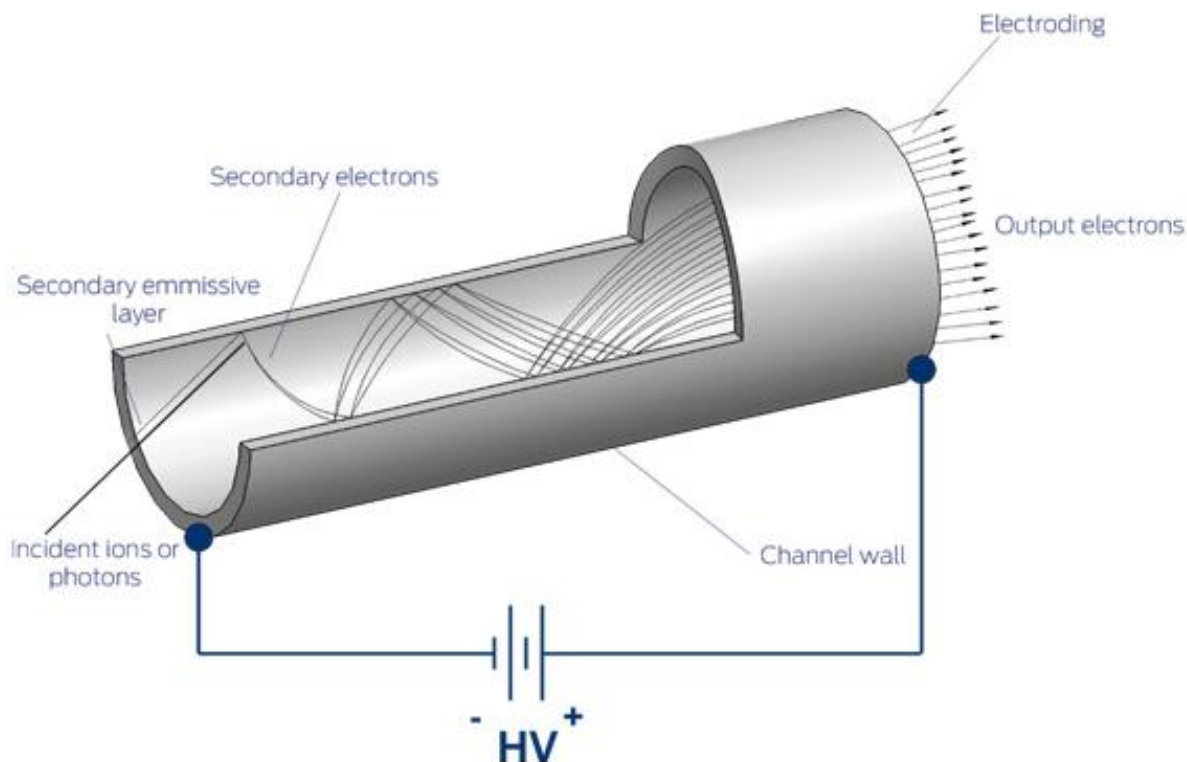


Figura 26. Funzionamento di un rivelatore a channeltron lineare Photonis® con enfasi sull'amplificazione del segnale (98).

INTERFACCE LC-EI-MS E STATO DELL'ARTE

La spettrometria di massa, nonostante nasca come tecnica stand-alone, ha trovato negli anni diffusione come metodica di routine grazie all'accoppiamento con la cromatografia. Le tecniche che prevedono questa combinazione sono definite ifenate (hyphenated) e sono suddivise in base allo stato di aggregazione delle molecole durante il processo analitico (cromatografia e ionizzazione). Come citato in precedenza, la sorgente di ionizzazione di riferimento per la gascromatografia è soprattutto la ionizzazione elettronica, mentre la grande classe delle ionizzazioni a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Ionization*, API) viene combinata con la cromatografia liquida. In entrambi questi casi, separazione e ionizzazione avvengono allo stesso stato di aggregazione; eventuali passaggi di stato sono previsti prima, come quanto accade negli iniettori per gascromatografia.

Le ionizzazioni API hanno esteso la spettrometria di massa permettendone una diffusione capillare in gran parte delle scienze naturali; ciononostante, queste sorgenti sono tutte basate su strategie di ionizzazione *soft*, ovvero a bassa energia, con tutti i limiti che ne conseguono. Con bassa energia viene definito un processo che incrementa l'energia della molecola di un quantitativo minimo, sufficiente alla generazione della carica ed all'eventuale rottura di legami particolarmente blandi i cui ioni frammento sono stabilizzati da intensi effetti elettronici. Per questo motivo i composti ionizzati tendono a frammentarsi poco o nulla rendendo lo ione molecolare col suo addotto estremamente intenso con ovvi vantaggi in termini di rapporto segnale rumore ma scarse o assenti informazioni strutturali; le ionizzazioni di questo tipo operano tutte a condizioni ambientali. Discriminare qualitativamente composti *isobari* (ossia composti con la stessa massa molecolare) è possibile solo con costosi analizzatori ad alta risoluzione in grado di misurare la massa accurata. Questo non è possibile per gli isomeri strutturali, molecole la cui formula bruta coincide e dunque solo con la discrezionalità del tempo di ritenzione cromatografico o con ulteriori frammentazioni indotte con analizzatori tandem è possibile identificare i composti.

Siccome la ionizzazione è una reazione chimica di scambio ionico o acido – base, questa è limitata alle sole molecole polari dotate di gruppi funzionali in grado di reagire; per queste ragioni non tutte le molecole sono ionizzabili a pressione atmosferica con le sorgenti API. Questo limite riguarda maggiormente l'ESI ed in maniera inferiore l'APCI ma, nessuna delle

due può essere usata per l'analisi di molecole completamente apolari come ad esempio molti idrocarburi. Non a caso questi analiti sono caratteristici della gascromatografia accoppiata a vari rivelatori tra cui anche la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica.

Infine, l'instaurarsi di equilibri termodinamici come quelli citati in precedenza, non può che risentire della compresenza di altre molecole. La competizione tra l'analita di interesse ed altre molecole della matrice per un protone H^+ od un qualsiasi catione metallico che può instaurarsi in una goccia di campione ionizzata ESI, determina un effetto matrice di tipo *ion suppression* con conseguente sottostima del segnale. Differentemente, la compresenza di più molecole della matrice in grado di contribuire alla ionizzazione può determinare una maggior efficienza rispetto a quanto registrato in soluzioni standard, con conseguente effetto di *ion enhancement* e sovrastima del segnale. L'effetto matrice in ESI può promuovere o sopprimere il segnale oltre al 100% con conseguenti errori grossolani nella quantificazione. Per ovviare a questa problematica viene impiegata la calibrazione a standard interno (*internal standard*, IS), ovvero vengono aggiunte molecole di riferimento in concentrazione nota sulle quali viene rapportato il valore del segnale relativo agli analiti. Per far sì che anche gli standard interni risentano della compresenza della matrice allo stesso modo degli analiti ma siano distinguibili, vengono impiegate molecole con le stesse caratteristiche chimico – fisiche ma diversa massa. Composti con queste caratteristiche sono i marcatori isotopici, ovvero molecole identiche agli analiti ma nelle quali determinati atomi della struttura (solitamente l'idrogeno col deuterio ma anche il C^{12} col C^{13}) sono sostituiti con i loro isotopi; in questo modo, al medesimo tempo di ritenzione la TIC data dalla somma del segnale dell'analita e quello dello IS (risolvibile per via software) sarà influenzata dall'intorno chimico allo stesso modo. L'uso di standard interni è inevitabilmente un passaggio in più che va a pesare sui costi vivi dell'analisi ed introduce una variabile extra tra i possibili errori.

La ionizzazione elettronica (*electron ionization*, EI) è una strategia di ionizzazione *hard*; ciò significa che l'energia ceduta nella sorgente eccede largamente il minimo richiesto per la formazione del radicale e l'eccedente viene ripercosso sui legami determinandone la rottura. Nel caso di legami particolarmente labili e di frammenti stabilizzati da intensi effetti elettronici di tipo elettron-donatore, possono seguire anche una o più ulteriori frammentazioni. Questo processo è interamente di tipo fisico, quindi la compresenza di altre molecole della matrice non modifica l'efficienza di ionizzazione o la risposta strumentale. L'esteso grado di frammentazione aumenta le informazioni ricavabili dallo spettro di massa

rendendo la ionizzazione elettronica la miglior sorgente per l'approccio *untargeted*. Il potenziale identificativo dello spettro EI emerge comparandolo ad un qualsiasi spettro da ionizzazione API (Figura 27).

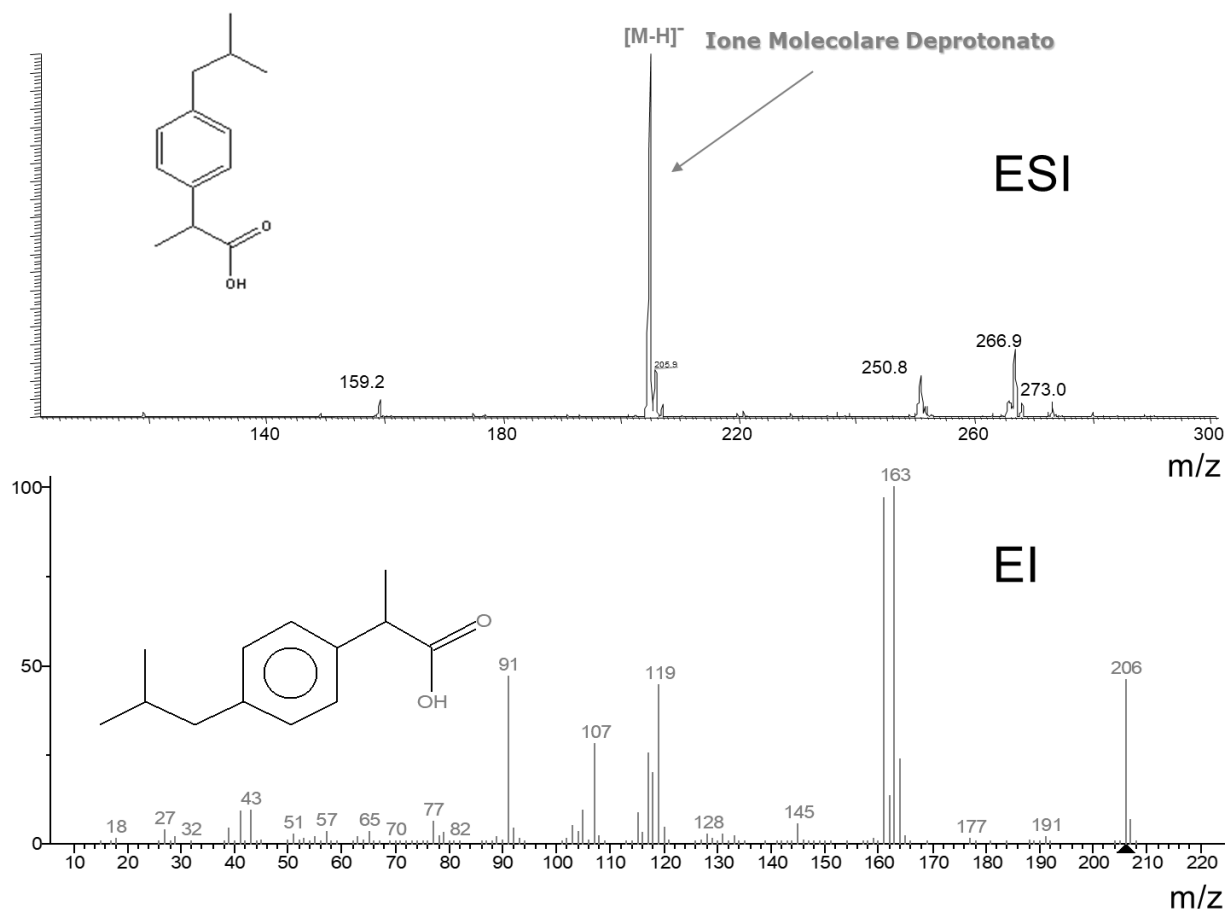


Figura 27. Comparazione - non in scala - tra gli spettri di massa ESI (sopra) ed EI (sotto) dell'ibuprofene (MM: 206 g/mol). Interessante notare come lo spettro EI sia ricco di ioni frammento al di sotto del rapporto m/z dello ione molecolare mentre lo spettro ESI mostra solo picchi relativi a m/z maggiori dello stesso (67).

Gli spettri di massa di composti puri registrati in EI sono raccolti nella libreria NIST (National Institute of Standards and Technology) e permettono il riconoscimento di molecole in campioni reali attraverso la loro comparazione con lo spettro sperimentale. La ionizzazione elettronica ha principalmente due grossi limiti:

- 1) Ridotta sensibilità: in EI l'efficienza di ionizzazione è molto bassa in quanto solo le molecole che intercettano il fascio di elettroni della sorgente diventano radicali. Inoltre, la conseguente frammentazione fa sì che il segnale delle molecole ionizzate vada a

ripartirsi tra i vari frammenti determinando un S/N sul singolo ione ancora inferiore. Questo secondo aspetto può esser limitato regolando il processo di ionizzazione ad energia ridotta (20 eV o meno) ed enfatizzando l'intensità dello ione molecolare, andando a perdere però i vantaggi nell'approccio untargeted. I LOD e LOQ in EI sono da 10^3 a 10^6 volte peggiori rispetto alle sorgenti API. Per questo motivo la ionizzazione elettronica non è la tecnica di riferimento (salvo preparative con fattori di arricchimento molto elevate) per analisi di composti in ultra-microtracce.

- 2) Condizioni operative: la EI opera con molecole in fase gassosa ed alto vuoto ($<10^{-5}$ Torr). Questi requisiti possono essere soddisfatti solo accoppiandola alla gascromatografia con flussi di carrier gas idonei. Anche il range di molecole ionizzabili viene di conseguenza limitato a quelle che possono esser separate in GC: composti ad elevata temperatura di ebollizione, ricchi di interazioni intermolecolari o ad alto peso molecolare, sono preclusi. Per quanto riguarda le forze intermolecolari è possibile intervenire ad esempio sui legami a idrogeno con un'opportuna derivatizzazione. Questa reazione organica riduce fortemente la polarità di un gruppo funzionale riducendo di conseguenza anche le interazioni intermolecolari e la temperatura di ebollizione. Per quanto riguarda il peso molecolare, problematica tipica delle macromolecole, è possibile intervenire con la loro idrolisi. Entrambe queste strategie sono molto problematiche, poco selettive, scarsamente riproducibili, provocano la perdita di molte informazioni ed in forte contrasto coi principi della GAC.

Visti pregi e difetti, la EI trova campo di applicazione nelle analisi ambientali ed in generale nel *compound discovery* (riconoscimento di composti). Il vincolo dell'impiego in gascromatografia, però, impedisce l'analisi diretta ma impone una estrazione preliminare per portare gli analiti in solventi idonei all'iniezione GC. Come menzionato in precedenza, l'EI soffre di effetto matrice minimo rendendo quindi la preparativa, passaggio critico sotto il punto di vista dei costi e della produttività oltre che ad alto impatto ambientale, meno critica. Per l'analisi diretta da matrici acquose sarebbe necessario l'accoppiamento con la cromatografia liquida ma questo è impedito dalle condizioni operative drasticamente opposte. Per raggiungere questo risultato sono state realizzate negli anni alcune interfacce LC-EI-MS senza però mai raggiungere grandi volumi nella produzione di serie.

Il primo tentativo di LC-EI-MS è stato il *Direct Liquid Introduction (DLI)*, un'interfaccia sperimentale particolarmente instabile e ricca di limitazioni che mai ha superato la fase di

prototipo (99) (100). Il DLI opera in una configurazione nella quale il liquido viene alimentato direttamente alla sorgente affidando al vuoto il compito di rimuovere il solvente. I flussi erano resi compatibili alle condizioni di lavoro dello spettrometro implementando splittaggi ed impiegando sistemi di pompaggio differenziale (101).

Un'altra interfaccia agli albori della LC-MS è stata il *Moving Belt*: si tratta di un sistema basato su un nastro sul quale viene depositato il liquido in uscita dal cromatografo (102). Col suo movimento il nastro trasporta il tutto in una camera adiacente nella quale è presente la sorgente EI settata alle sue condizioni operative dove gli analiti passano in fase vapore e vengono ionizzati (103). Anche il *Moving Belt* ha avuto successo limitato ed è stato rapidamente accantonato a favore di soluzioni più promettenti (104).

Il passo successivo è stato il *thermospray*; fondamentalmente si tratta della prima interfaccia LC-MS della storia e, fino all'emergere delle API nel 1992, rimase l'unica (105). Lo schema dell'interfaccia è riportato in Figura 28.

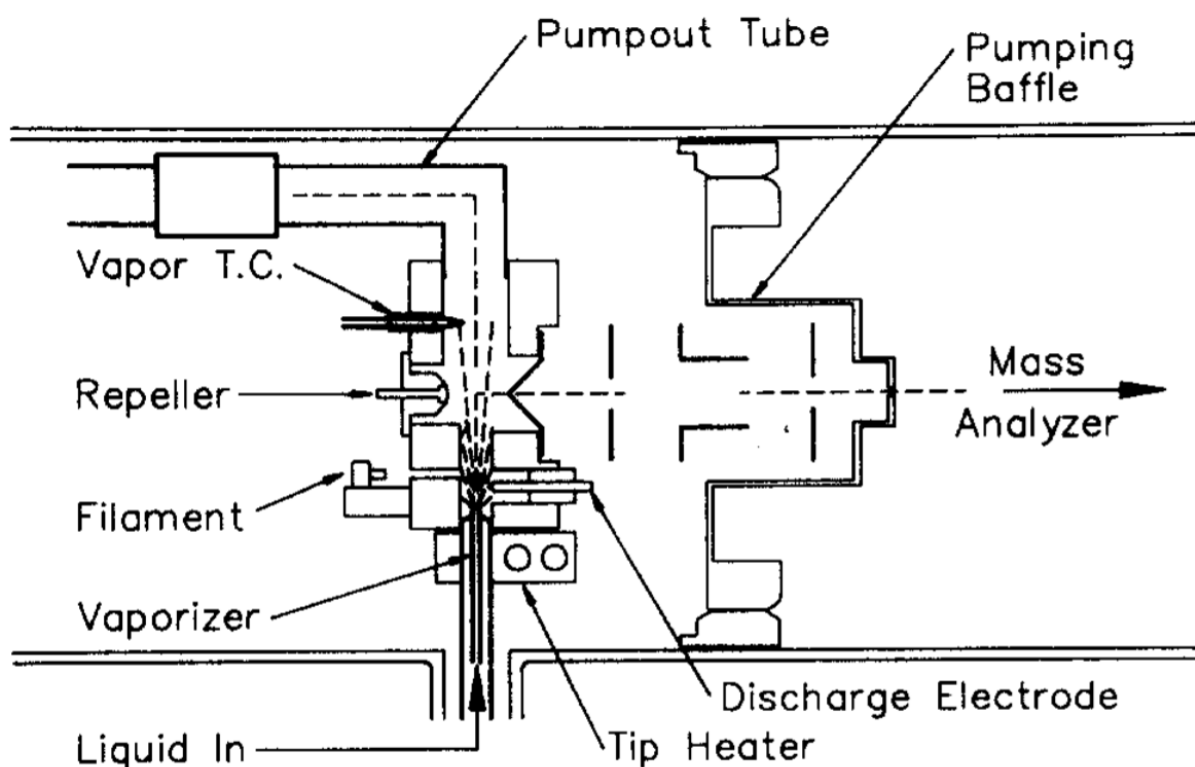


Figura 28. Schema dell'interfaccia thermospray con dettagli della camera di vaporizzazione-ionizzazione (106).

Il *thermospray* venne sviluppata dal gruppo di Vestal presso l'Università di Huston (Texas) nel 1980 (106), brevettata nel 1983 e commercializzata dalla Vestec; l'interfacciamento si basa sulla vaporizzazione per via termica del flusso di eluato proveniente dall'uscita della colonna LC (107). Questo viene quindi convertito in un insieme di vapori e gocce microscopiche detto *spray* che viene dunque ionizzato per via fisica attraverso una scarica a bassa tensione prodotta da un elettrodo dedicato (108). Un apposito *repeller* messo immediatamente dopo l'elettrodo direziona le particelle cariche in direzione perpendicolare al flusso, verso l'analizzatore (109). Nonostante la ionizzazione sia basata su una variante di EI, il processo prevede la combinazione di 3 fenomeni (evaporazione del solvente, reazione acido – base e formazione del *plasmaspray* attraverso la EI) che avvengono tutti a pressione atmosferica, posizionando di diritto il *thermospray* tra le API. Inoltre l'energia coinvolta nel processo è insufficiente a dare una frammentazione estesa e gli spettri ottenuti sono incompatibili con quelli registrati nella libreria NIST.

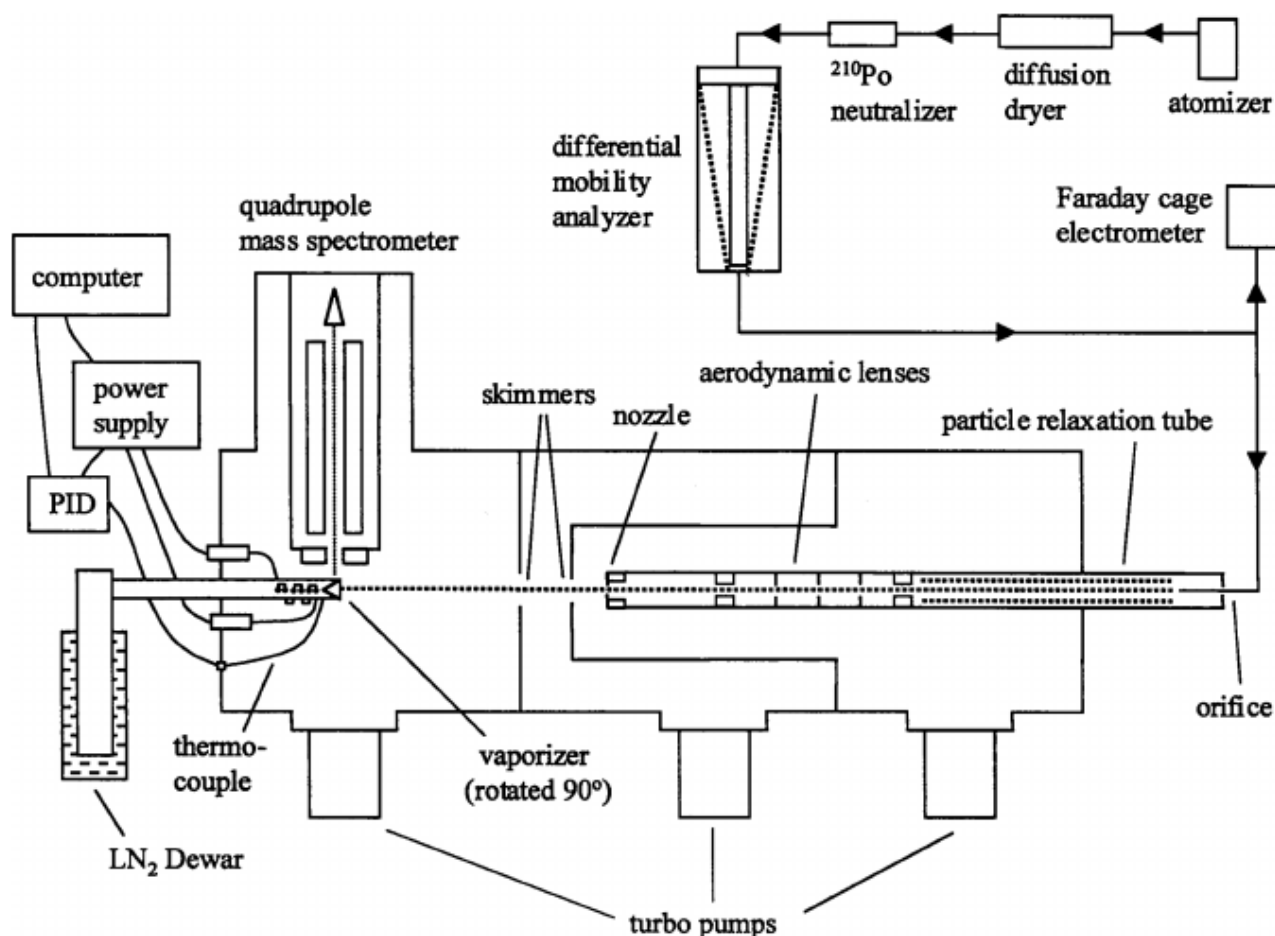


Figura 29. Schema dell'interfaccia Particle-Beam con dettagli di tutti gli ausiliari (110).

Il primo caso di vera tecnica interfacciata LC-EI-MS è stato il *Particle Beam* (PB), un'interfaccia non ionizzante usata per trasformare l'eluato liquido in un aerosol di particelle da destinare alla sorgente (111). Si tratta di un dispositivo interposto tra lo spettrometro di massa e l'uscita della colonna LC nel quale si ha il passaggio di stato liquido – aeriforme (Figura 29); al suo interno, si ha la formazione di un aerosol le cui gocce vanno gradualmente de-solvatandosi con l'evaporazione della fase mobile (112). L'aerosol viene formato all'uscita di un capillare proveniente dal sistema LC utilizzando una corrente di elio addizionata al liquido prima della sua uscita; il capillare impiegato viene appositamente riscaldato in modo da cedere entalpia al flusso di particelle liquide in uscita agevolando il passaggio di stato (113). La corrente così generata viene fatta passare attraverso un sistema di vuoto progressivo e skimmer in modo da rimuovere le particelle più grandi e tutto il solvente evaporato (114). A evaporazione del solvente terminata gli analiti vengono convogliati all'interno della sorgente come un fascio di particelle (da qui il nome *particle beam*), e ionizzati secondo il processo EI convenzionale (115). Anche i sistemi LC-PB-MS hanno avuto vita abbastanza breve, nonostante la buona vivacità scientifica legata ai risultati incoraggianti ottenuti (116). Il *particle beam* infatti riusciva ad estendere i vantaggi della EI anche alla cromatografia liquida ma la scarsa efficienza intrinseca al passaggio di stato (importante perdita di analita durante il passaggio nei sistemi di skimmer sequenziali) sommata alla minor sensibilità della EI comparata alle tecniche soft, rendevano questa interfaccia analiticamente poco prestazionale (117). Il *particle-beam* si era dimostrato anche lineare per un range di concentrazioni troppo ristretto oltre che insufficientemente sensibile con fasi mobili ad alta concentrazione di acqua (118).

La vera chiave di volta nell'interfacciamento LC-EI-MS avvenne proprio nello sviluppo del *particle-beam*; il requisito fondamentale per il funzionamento della EI è l'alto vuoto. Questa condizione non può essere garantita alimentando un flusso di liquido dell'ordine delle centinaia di $\mu\text{L}/\text{min}$ in quanto questi, a seguito del passaggio di stato, diventerebbero quantità di gas di volume totalmente incompatibile. Negli anni in questione stava emergendo la questione green chemistry e, con questa, la spinta alla miniaturizzazione delle strumentazioni ambientalmente più impattanti. L'avvento dei cromatografi liquidi su scala capillare prima, e nano poi, ha reso il flusso di fase mobile compatibile col vuoto EI, facilitandone l'interfacciamento; conseguenze di queste evoluzioni furono il *micro particle-beam*, ma soprattutto il Direct-EI (Figura 30). L'interfaccia Direct-EI è attualmente lo stato

dell'arte nella combinazione LC-EI-MS; esso infatti combina i vantaggi degli spettri EI con un'ottima linearità, stabilità, riproducibilità e robustezza (119). Il suo primo prototipo venne presentato nel 2001 dal gruppo del Prof. Cappiello presso il quale sono stati ottenuti anche i risultati che verranno esposti nella parte sperimentale di questa tesi (120).

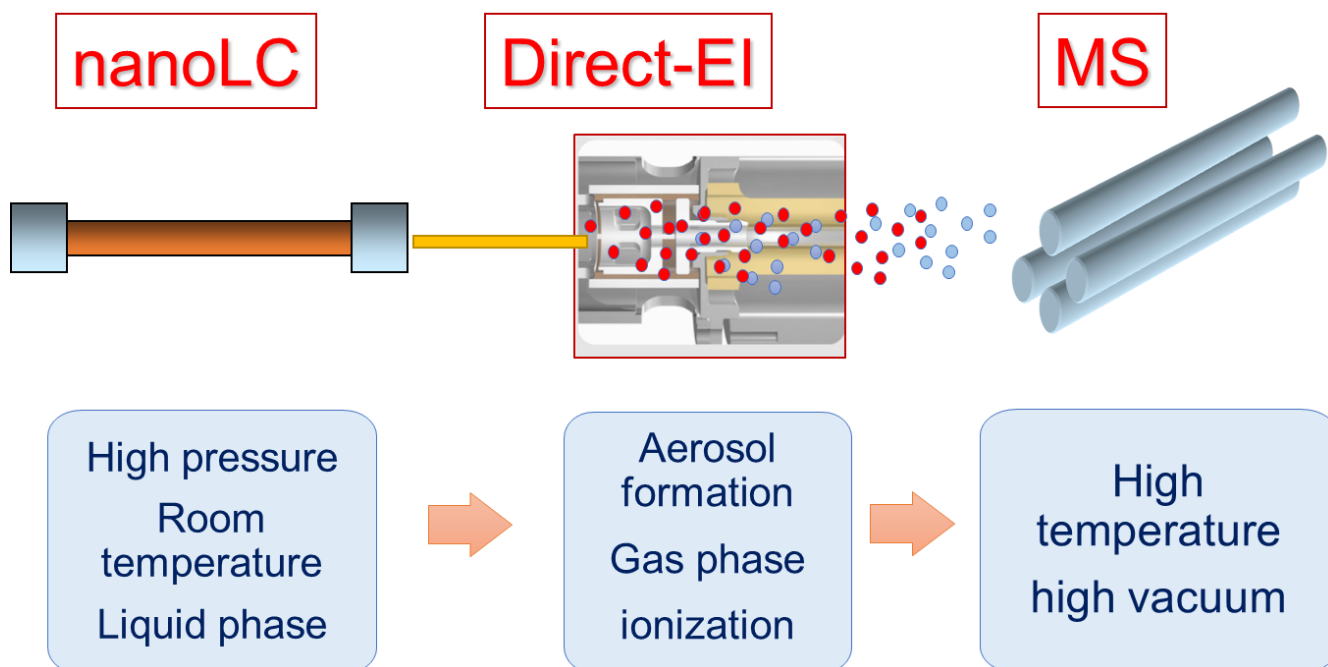


Figura 30. Passaggi chiave nel funzionamento dell'interfaccia non ionizzante Direct-EI.

Il principio di funzionamento del Direct-EI è molto semplice e non richiede componenti particolari; il liquido in uscita dall'apparato nano-LC viene alimentato direttamente all'interno della sorgente attraverso un capillare di *peek* (polyetheretherketone) la cui posizione è parametro determinante. Grazie alla condizione di alto vuoto ed all'alta temperatura della sorgente, il liquido passa da liquido a vapore istantaneamente all'interno del volume ionico, sito nel quale viene direttamente ionizzato. Con un settaggio del capillare in cui l'uscita è troppo a ridosso della sorgente, la vaporizzazione risulta non completa al momento della ionizzazione con prestazioni insoddisfacenti, mentre una posizione più arretrata espone il liquido a condizioni di vuoto e temperatura insufficienti per un passaggio di stato "flash" (121). In questo senso, l'interfaccia Direct-EI è molto sensibile alle regolazioni, e le condizioni operative sono un compromesso tra quelle ottimali di vari composti e varie composizioni di fase mobile (122). Diversamente dalle altre interfacce LC-EI-MS, il Direct-EI riesce a combinare un range di utilizzo molto più ampio sia in termini di

caratteristiche chimico – fisiche degli analiti che di composizione della fase mobile a livelli di sensibilità e riproducibilità compatibili con le esigenze di un detector reale e non solo prototipo. Uno schema del funzionamento del Direct-EI è riportato in Figura 31.

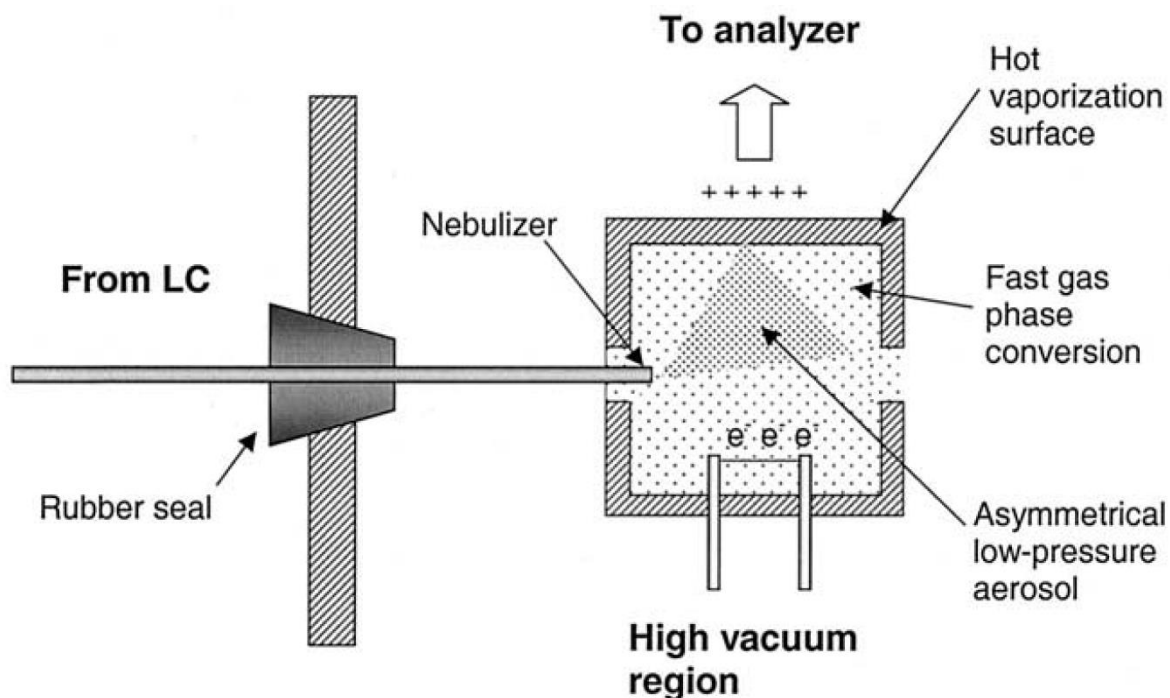


Figura 31. Sezione dell'interfaccia Direct-EI e del suo funzionamento all'interno della sorgente a ionizzazione elettronica (119).

Gli spettri registrati con questo sistema risultano perfettamente sovrapponibili a quelli registrati nelle librerie NIST ed anche eventuali reazioni chimiche concomitanti alla vaporizzazione del flusso risultano di incidenza marginale. Questo aspetto non deve essere considerato come irrilevante in quanto la presenza di molecole con H^+ acidi nella fase mobile come H_2O o CH_3OH può dar luogo ad equilibri acido – base con analiti a carattere basico i quali verrebbero quindi ionizzati chimicamente (bassa energia, scarsa frammentazione, intenso ione quasi-molecolare) e non attraverso la ionizzazione elettronica (alta energia, ricca frammentazione, informazioni strutturali) (123). La concomitanza di EI e CI determina la presenza di frammenti provenienti da due pattern diversi, rendendo lo spettro incomprensibile; la contemporanea presenza dei due fenomeni è evidenziata dall'intensità maggiorata del picco corrispondente allo ione molecolare più la massa del protone $[M+H]$. Il Direct-EI inoltre, essendo basato su un fenomeno fisico come la ionizzazione elettronica, non

soffre di importante effetto matrice come le altre tecniche LC-MS; questo aspetto è legato all'assenza di interazione chimica tra molecole, matrice e fase mobile come per quanto detto sull'assenza di ionizzazione chimica. Infine, diversamente dalle ionizzazioni API, non ci sono limiti alla natura dei composti da analizzare e quindi anche molecole apolari prive di gruppi funzionali generano segnali (124). Il Direct-EI riesce a coprire quella categoria di molecole troppo altobollenti per la GC-MS ma non adeguatamente funzionalizzate per poter essere trattate in LC-MS con sorgenti API. Inoltre, varie applicazioni sono state condotte su composti che per analisi gascromatografica avrebbero richiesto procedure di derivatizzazione contrarie ai requisiti della GAC. Infine, questa interfaccia si pone come strategia vantaggiosa per molecole apolari (quindi inadatte alla LC-MS convenzionale) disperse in acqua le quali avrebbero richiesto una preparativa dedicata per l'analisi GC-MS (125). I limiti del Direct-EI sono, come accennato in precedenza, i limiti LOD e LOQ di alcuni ordini di grandezza maggiori rispetto alle API, e la presenza di un "limite" superiore di composti analizzabili; molecole particolarmente altobollenti che non riescono a passare in fase aeriforme durante il flash termico in uscita dal capillare, non vengono ionizzate e quindi non sono rilevabili. Inoltre, la loro possibile condensazione va ad occludere la sezione del capillare imponendo lo stop all'analisi ed un intervento di manutenzione per il proseguo degli esperimenti (126). Questo fenomeno ha luogo quanto per gli analiti che per i componenti della matrice presenti nel volume di iniezione. Per questo motivo, campioni ricchi di polimeri e/o macromolecole necessitano di una loro rimozione precedente all'iniezione (127).

Alcune altre interfacce LC-EI-MS sono state sviluppate nel corso degli ultimi 20 anni; tra queste merita menzione il Supersonic Molecular Beam (128) con Cold EI (129) riportato in Figura 32; questo prototipo, estremamente valido e di grande interesse, esula dagli obbiettivi della ricerca descritta in questa tesi e non verrà trattato.

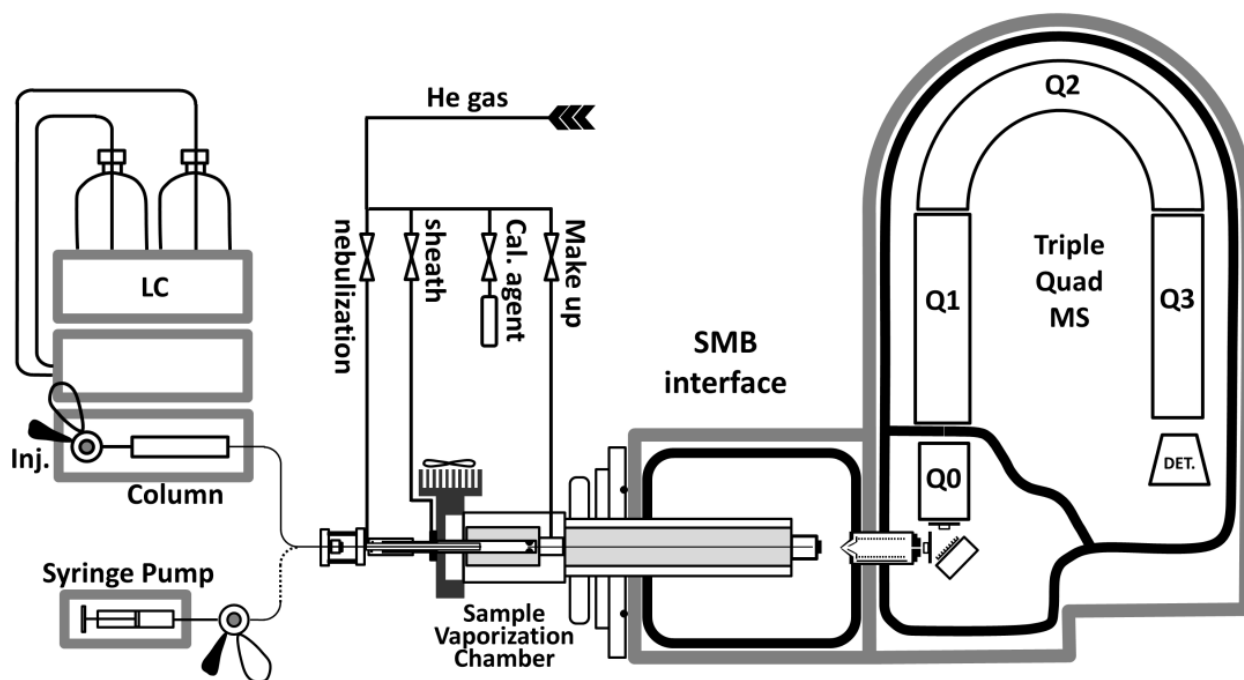


Figura 32. Rappresentazione di un sistema LC-SMB-MS con dettaglio dell'interfaccia e delle correnti ausiliarie.

PARTE SPERIMENTALE

In questa tesi sono riportati i risultati del lavoro di ricerca di tre anni del corso di dottorato in Scienze di Base e Applicazioni dell'Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", curriculum in Scienze Chimiche e Farmaceutiche. Le principali tematiche affrontate sono state due:

- Sviluppo, creazione di un prototipo ed impiego in diverse applicazioni di un'interfaccia per accoppiare cromatografia liquida e spettrometria di massa a ionizzazione elettronica. Questo nuovo dispositivo si pone come un'evoluzione del Direct-El, del quale estende il campo di applicazione e ne migliora la robustezza. Sviluppare un nuovo dispositivo è un lavoro estremamente dispendioso sia in termini di tempo che di risorse economiche in cui la gran parte degli esperimenti da risultati insoddisfacenti ed inutilizzabili per la stesura di un articolo scientifico. Inoltre un'analisi fluidodinamica e termodinamica è stata necessaria per il progresso dell'interfaccia. Gli step più rilevanti ed i risultati ottenuti nelle applicazioni condotte con l'interfaccia Liquid-El saranno presentati e discussi. Per l'interfaccia Liquid-El è stata presentata domanda di brevetto internazionale dal nome "Macchina per analisi chimica comprendente la combinazione della spettrometria di massa a ionizzazione elettronica con la cromatografia liquida" che è stata accettata ed è attualmente in fase di revisione.
- Sviluppo di un protocollo di estrazione green per la determinazione di benzodiazepine in residui di bevande manipolate in casi di "*Drug Facilitated Crime*". Questa applicazione è frutto di un lavoro di lungo corso in ambito forense che ha visto la messa a punto di una metodica per l'estrazione di benzodiazepine da bevande alcoliche basate su creme di latte con determinazione GC-MS (130), e un'altra basata sull'estrazione MEPS per superalcolici con determinazione nano UHPLC-UV (25). Il protocollo sviluppato è basato sulla metodica DLLME con quantificazione HPLC capillare – UV, ed i risultati sono comparati con gli stessi ottenuti impiegando la procedura di estrazione MEPS citata in precedenza. L'applicazione della DLLME per l'estrazione di benzodiazepine è stata oggetto di un'unica pubblicazione relativa al plasma umano (131) ed una sulle acque di scarico di ospedali (132) ma nessuna in ambito forense su residui di bevande alcoliche ed analcoliche.

CAPITOLO 1: L'INTERFACCIA LIQUID-EI

ABSTRACT

Compound discovery is of increasing importance in various fields such as environmental, food safety, forensic, and other investigation areas where the presence of non-targeted compounds represents a key factor. The actual trend is towards the identification of developing threats and potential safety issues, at their early stages, through non-targeted monitoring analysis technologies. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) has demonstrated to be the best technique and plays a central role in routine analysis, whereas gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is limited to those volatile substances that are suitable for gas-phase separation.

Electrospray (ESI) is one of the most frequently used LC-MS ionization techniques, thanks to its specificity, detection limits, and flexibility. However, ESI response is influenced by the chemical background and limited by the nature of the analyte. Because the ionization is based on a low energy chemical reaction, the fragmentation is weak and lacks structural information. Conversely, electron ionization (EI) is not influenced by the nature of the analyte and matrix composition. It provides 70 eV spectra that can be compared with those recorded in electronic libraries that acts as a molecular fingerprint. Considering that EI-MS works appropriately in gas-phase and high-vacuum conditions, coupling it with liquid chromatography is a challenging goal. An innovative liquid chromatography-mass spectrometry interface is presented and discussed.

This new interface, called Liquid-EI (LEI), is based on electron ionization but it differs from other previous attempts because analyte and mobile phase vaporize before entering the ion source. The vaporization takes place at atmospheric pressure into a specifically designed chamber called vaporization micro-channel, placed between the LC apparatus and the high-vacuum ion source. The interface is entirely independent and can be a compelling upgrade for every GC-MS system providing a rapid and reversible LC-MS conversion. A commercial fused silica liner, placed inside the vaporization micro-channel, acts as an inert vaporization surface, speeding up the gas-phase conversion of large molecules while lessening possible memory effects. The liner is a replaceable component for simplified maintenance. LEI extends the NIST libraries access to liquid chromatography, providing a powerful tool in the untargeted approach. To optimize the liquid-to-

gas conversion efficiency, several upgrading has been developed to make this step takes place only inside the vaporization micro-channel.

The advantages of using LEI are various; because the ionization is a physical process, it is not influenced by the chemical properties of the analyte and the chemical background. These features allow the system to have no polarity limitation and minimized matrix effects. Using LEI high-quality EI spectra are acquired, speeding up the compound discovery process. Its highlights are of great potential for flexible and direct targeted and non-targeted approaches. The development, the optimization and several different applications based on the use of LEI-LC-MS are here presented and explained.

INVENZIONE DELL'INTERFACCIA LIQUID ELECTRON IONIZATION

Come solitamente accade nel progresso tecnologico, per fare “un passo avanti” si deve prima fare un “passo indietro”. Dell'interfaccia Direct-El, stato dell'arte nell'accoppiamento di spettrometria di massa EI e cromatografia liquida all'inizio dei lavori sulla nuova interfaccia, si è ampiamente discusso nell'introduzione; nonostante l'importanza dei suoi punti di forza erano anche noti i suoi limiti e punti deboli. I vantaggi garantiti dal Direct-El sono:

- Generazione di spettri di massa EI perfettamente comparabili a quelli registrati nelle librerie elettroniche. Questo aspetto, sicuramente quello di maggior rilievo, rende il Direct-El uno strumento formidabile nel riconoscimento di molecole organiche.
- La risposta strumentale è insensibile alla composizione della fase mobile, garantendo una risposta insensibile alle condizioni cromatografiche non comune ai sistemi convenzionali.
- L'uso della ionizzazione elettronica minimizza l'incidenza dell'effetto matrice. Questo vantaggio rende più semplici le operazioni di preparazione del campione e rende meno problematica una eventuale co-eluzione degli analiti.
- Il Direct-El può essere installato su qualsiasi spettrometro con sorgente EI a prescindere dal tipo di analizzatore impiegato. Anche per quanto riguarda il cromatografo liquido non vi sono limitazioni di sorta grazie all'uso di sistemi di “splittaggio” post-colonna per i sistemi a flussi capillari o maggiori.

In contrapposizione ai vantaggi di cui sopra, l'interfaccia soffre di tutta una serie di problematiche poste in essere dal suo limite principale: l'efficienza del passaggio di stato liquido-vapore. La vaporizzazione, infatti, avviene direttamente all'uscita del capillare proveniente dal sistema LC, ovvero a ridosso dell'ingresso all'interno della sorgente. La spinta termodinamica che determina il passaggio di stato è prima di tutto il vuoto e solo in minor parte l'alta temperatura della sorgente. L'interfaccia lavora a temperatura ambiente quindi il flusso riceve calore solo in minima parte dalla sorgente; l'entalpia necessaria viene fornita soprattutto dall'energia già presente e la trasformazione è principalmente adiabatica. Considerando questi aspetti, il processo appare limitato e con un'efficienza migliorabile. Gli svantaggi di cui sopra sono:

- Range di punti di ebollizione dei composti ionizzabili limitato. Diversamente dalle sorgenti API, dove il limite è per la polarità degli analiti, nel Direct-El le molecole devono essere in fase gassosa per essere ionizzate; per questo i composti che non riescono a passare di stato in condizioni pseudo-adiabatiche precipitano come solido all'uscita del capillare.

- Ridotta affidabilità strumentale. Il solido che si accumula nella parte finale del capillare per mancata vaporizzazione può determinare la sua occlusione e lo stop dell'analisi.
- Difficoltà nel setting della configurazione di lavoro. Il sistema è molto sensibile a parametri come la posizione dell'uscita del capillare di alimentazione. Per questo motivo anche una minima differenza nel suo posizionamento tra una sessione di lavoro ed un'altra determina la non comparabilità dei risultati. Le condizioni ottimali oltretutto non sono le stesse per tutti gli analiti.

Partendo da questi presupposti appare chiaro che il miglioramento va ricercato nell'efficienza di vaporizzazione. Per migliorare questo aspetto si è cercato di sostituire il processo in condizioni adiabatiche con un ben più efficace processo in condizioni isoterme. Questo risultato è stato raggiunto spostando il passaggio di stato prima che le molecole entrino nella sorgente, ovvero in un ambiente dedicato, a temperatura che promuova il processo senza indurre reazioni di degradazione. Nel primo prototipo della nuova interfaccia, una camera di vaporizzazione viene interposta tra lo spettrometro di massa e l'uscita della colonna LC (Figura 33).

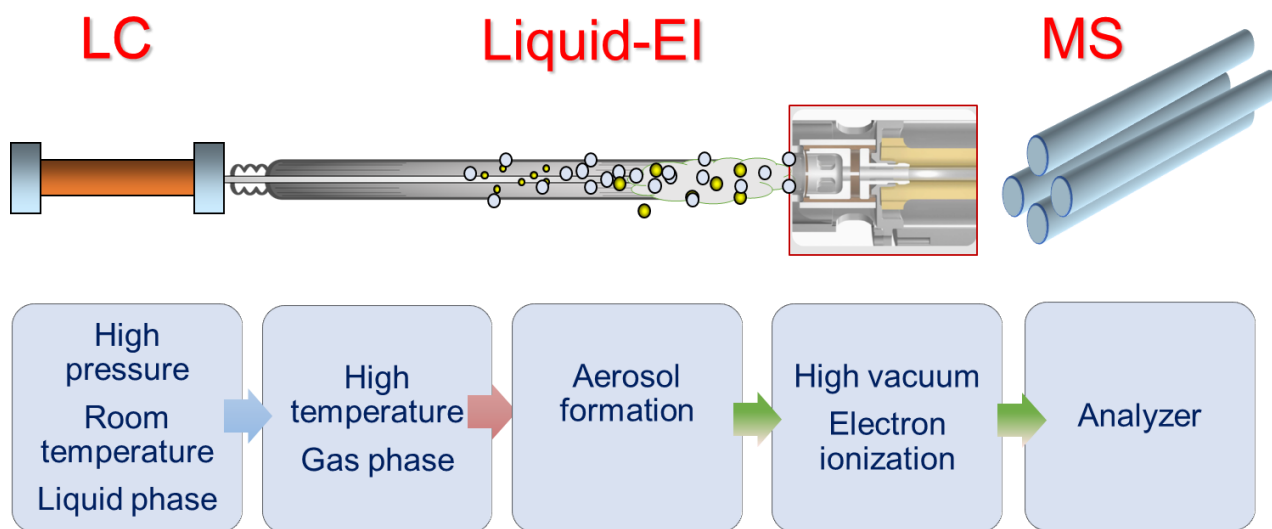


Figura 33. Schematizzazione dei processi coinvolti nel funzionamento dell'interfaccia Liquid-El.

Questa camera è costituita dalla transfer-line che viene impiegata per connettere il gascromatografo con lo spettrometro ed al cui interno si trova la parte finale della colonna GC. Dal punto di vista realizzativo si tratta di un tubo metallico lungo 16,5 cm e dal diametro interno di 1 mm che si trova vincolato ad una flangia a tre viti per il fissaggio allo spettrometro; la flangia è

posizionata in modo da far entrare circa 4 cm della lunghezza all'interno dello strumento ed il resto fuori. Attorno alla parte esterna della camera di vaporizzazione, nel lato pre-spettrometro, viene posizionato un manicotto in lega di alluminio dotato di una resistenza riscaldante interna e di una termocoppia per la lettura della temperatura; resistenza e termocoppia sono collegate ad un sistema di regolazione della temperatura in grado di spaziare dal valore ambiente fino a 400°C (Figura 34).



Figura 34. Camera di vaporizzazione e dettaglio dall'alto della stessa con installato il manicotto riscaldante: si può notare la presenza di due inserti, il più grande è la resistenza riscaldante mentre il più piccolo è la termocoppia.

All'interno della camera di vaporizzazione viene posizionato il capillare in uscita dalla colonna cromatografica o comunque dal sistema di alimentazione della fase mobile. Questo capillare è un componente commerciale in silice fusa ricoperto di polimide con un diametro esterno di 375 μm ed interno variabile da 10 μm a 75 μm . Parallelamente, un tubicino recante un flusso misurato di elio viene connesso alla camera di vaporizzazione; il gas alimentato viene regolato attraverso una valvola a spillo esterna ad una portata di circa 1 mL/minuto. I flussi dell'eluato liquido e dell'elio sono accoppiati attraverso un punto sommatore metallico Swagelok di tipo tee connesso sulla parte più esterna della camera di vaporizzazione attraverso un'apposita filettatura. Il flusso di elio passa nello spazio tra l'esterno del capillare e l'interno della camera di vaporizzazione in modo da

aiutare il trasferimento dei vapori prodotti e da ridurre il tempo di residenza delle molecole esposte ad alta temperatura e vuoto. In questo modo, grazie anche al carattere inerte del gas ed alla totale assenza di ossigeno, l'incidenza di eventuali fenomeni di degradazione viene ridotta al minimo.

L'ingresso della camera di vaporizzazione e la sua connessione con il punto sommatore ed i capillari vengono resi isolati dalle condizioni ambientali con le tenute usate in gascromatografia nel lato caldo, e con tenute da cromatografia liquida nel lato freddo, in modo da garantire il mantenimento dell'alto vuoto.

Il sistema così configurato esegue la cromatografia in fase liquida con tutti i vantaggi della LC mentre, grazie all'interfaccia Liquid-El, la ionizzazione avviene su molecole in fase gas, esattamente come se la separazione fosse avvenuta con il carrier gas in GC.

La posizione del capillare all'interno della camera di vaporizzazione determina le condizioni a cui si trova il liquido al momento della sua uscita, ovvero a cui avviene il passaggio di stato; una posizione troppo arretrata coincide con pressione troppo elevata e temperatura troppo bassa tali da rendere la vaporizzazione inefficiente, con conseguente allargamento della banda cromatografica e perdita di risoluzione. In contrapposizione, un posizionamento troppo avanzato espone il liquido a vuoto e temperatura troppo elevati tali da promuovere l'evaporazione prematura della fase mobile all'interno del capillare con conseguente precipitazione degli analiti. La posizione di lavoro ottimale è quindi frutto di un compromesso e, in maniera simile ma meno sensibile rispetto al Direct-El, non è la stessa per tutti i composti.

L'interfaccia così sviluppata è stata battezzata come Liquid-El o, più brevemente, LEI. Uno schema della configurazione è riportato in Figura 35.

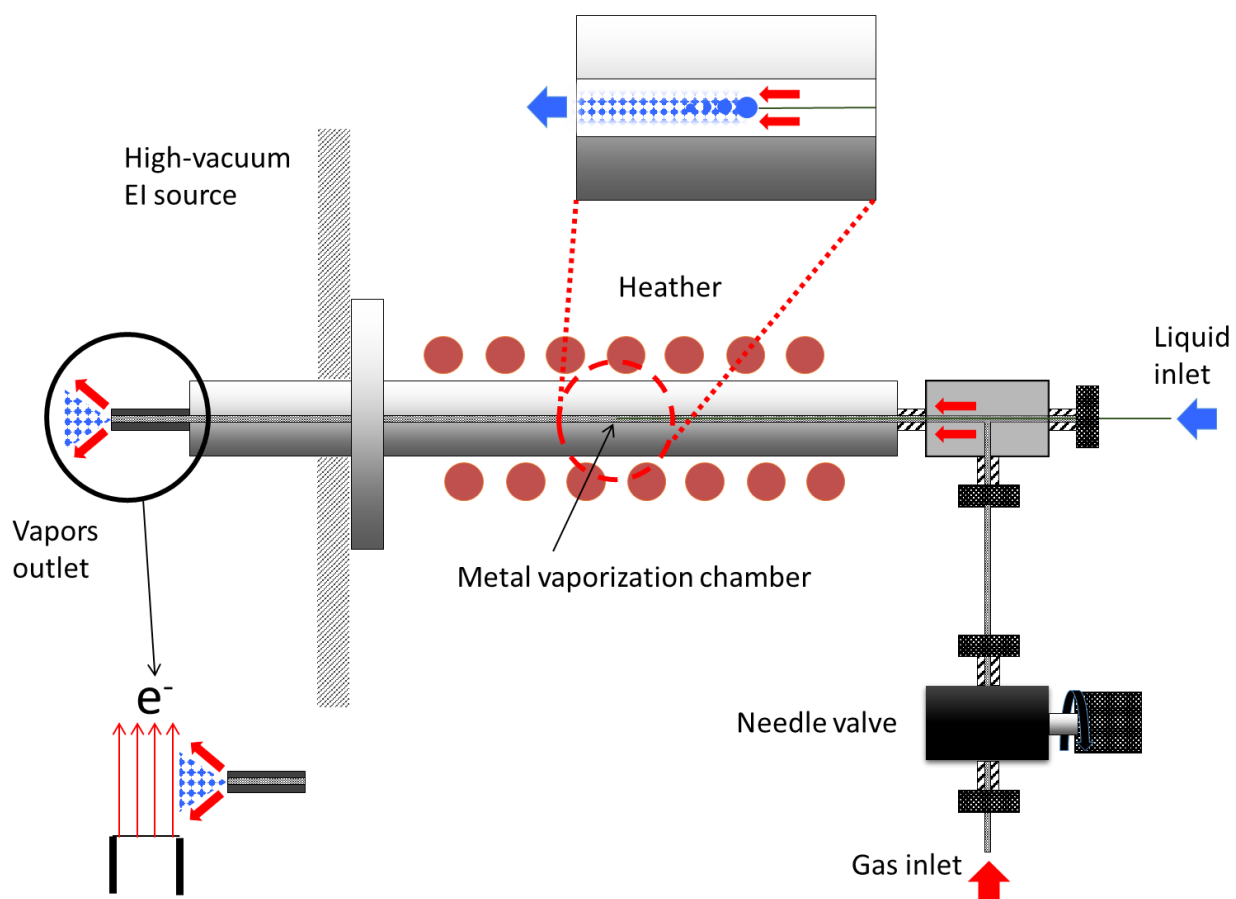


Figura 35. Primo prototipo dell'interfaccia LEI con dettaglio della camera di vaporizzazione e del punto sommatore a tre vie; il flusso di elio era regolato con una valvola a spillo previa calibrazione della stessa.

PRIMO PROTOTIPO

Partendo dall'esperienza del Direct-El appare chiara l'importanza dei parametri strutturali come dimensioni e posizione del capillare proveniente dal cromatografo liquido, la temperatura della camera di vaporizzazione, la velocità del liquido e la portata di elio. Per lo svolgimento di questi test di messa a punto sono state impiegate principalmente due miscele standard a diverse concentrazioni:

- Caffaina in H₂O: CH₃CN – 50:50.
- Mix di Naftalene, Indeno(1,2,3-c,d)pirene e Dibenzo(a,h)antracene ovvero tre Idrocarburi Policiclici Aromatici (*IPA* o *PAHs*, *Polycyclic Aromatic Carbons*) a diversa temperatura di ebollizione in CH₃CN.

La scelta di questi composti risiede nelle loro caratteristiche intrinseche e nell'uso comune che se ne fa; la caffeina è un composto a media polarità ampiamente analizzato in gascromatografia che serve per verificare il livello di prestazioni minime del sistema. Se l'impiego dell'interfaccia non desse prestazioni soddisfacenti nell'analisi di composti da GC-MS sarebbe indicazione che la direzione intrapresa non promette sviluppi interessanti. La miscela di IPA invece permette di capire le potenzialità del sistema con composti altobollenti (Indeno(1,2,3 cd)pirene e Dibenzo(a,h)antracene sono entrambi C₂₂ con temperature di ebollizione di, rispettivamente 526°C e 524°C (133)) che quindi vengono vantaggiosamente separati in cromatografia liquida ma che, a causa della quasi totale apolarità, non possono essere ionizzati con sorgenti *ambient* come ESI o APCI. La presenza di una molecola leggera come il naftalene, tipicamente analizzata in gascromatografia, fa da “cartina di tornasole” sul funzionamento corretto dell'apparato.

Il primo parametro studiato è stato il diametro interno del capillare che dal cromatografo liquido reca la fase mobile e l'eluato nella camera di vaporizzazione. Questo parametro è importante in quanto, a parità di flusso volumetrico, un capillare di diametro più ampio assicura da un lato una maggior superficie esposta alla vaporizzazione ed una velocità lineare del liquido inferiore dall'altro. La risultante di questi due aspetti risulta in un diametro intermedio che funge da miglior compromesso. Gli esperimenti sono stati effettuati in configurazione Flow Injection Analysis (FIA), ovvero senza cromatografia, alle seguenti condizioni:

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O: CH₃CN 50:50, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL).

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, posizione del capillare impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (m/z: Q 194, 109, 82).

I risultati dei test registrati con la soluzione standard di caffeina 10 µg/mL a diverse temperature sono riportati in Figura 36 e Figura 37.

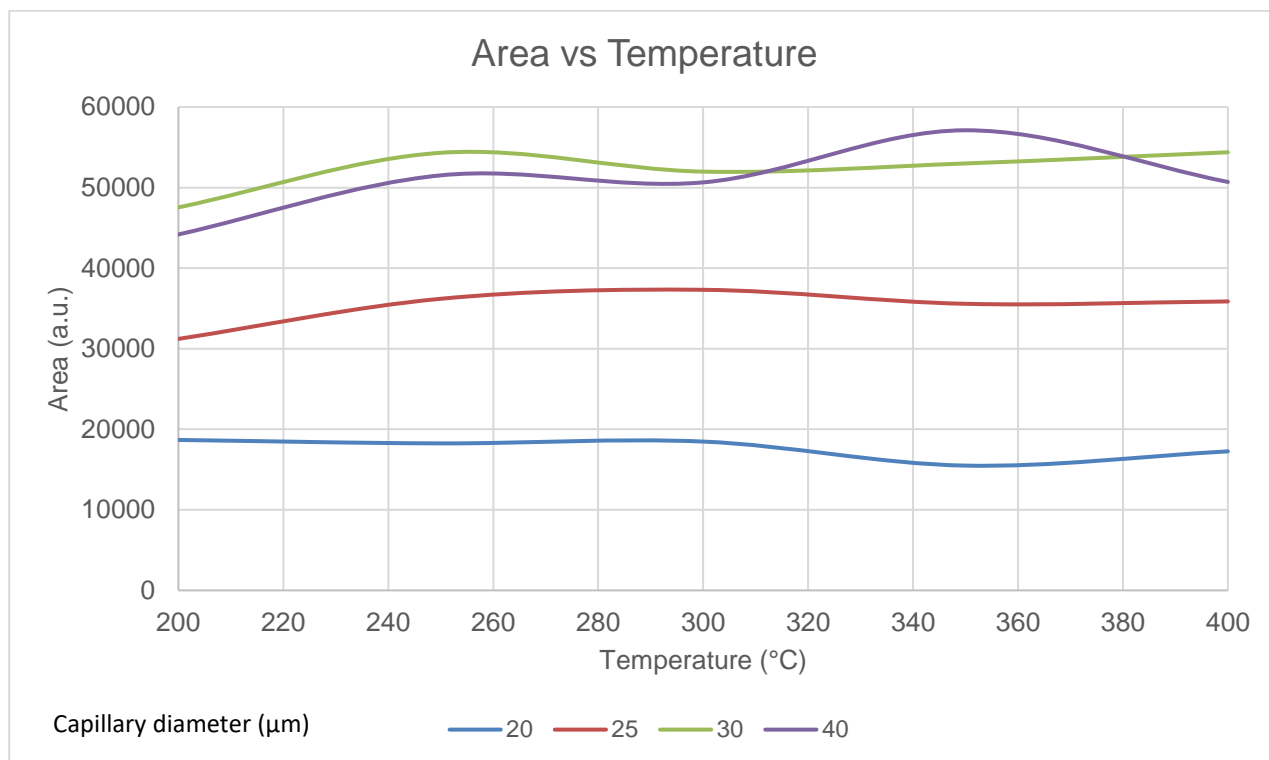


Figura 36. Area del picco TIC della soluzione di caffeina con diversi diametri di capillare ed a diverse temperature. L'area viene espressa in *arbitrary units* (a.u.) come riportato nell'interfaccia strumentale.

Dall'analisi dei grafici per la soluzione di caffeina si vede come all'aumentare del diametro del capillare aumenti sia l'area del picco (Figura 36) che la sua ampiezza (Figura 37). Questo comportamento non è necessariamente indice di una miglior efficienza di vaporizzazione e, viceversa, corrisponde ad un peggioramento del rapporto S/N dovuto al forte aumento dell'ampiezza del picco. La temperatura non influenza in alcun modo l'efficienza della vaporizzazione in nessuno dei quattro diametri testati in quanto l'area dei picchi rimane costante; contemporaneamente si evidenzia una riduzione dell'ampiezza del picco all'aumentare della temperatura, indice di un miglior profilo e miglior performance analitica. Questo fenomeno è

maggiormente marcato per i diametri più piccoli i quali determinano una velocità lineare del flusso superiore.

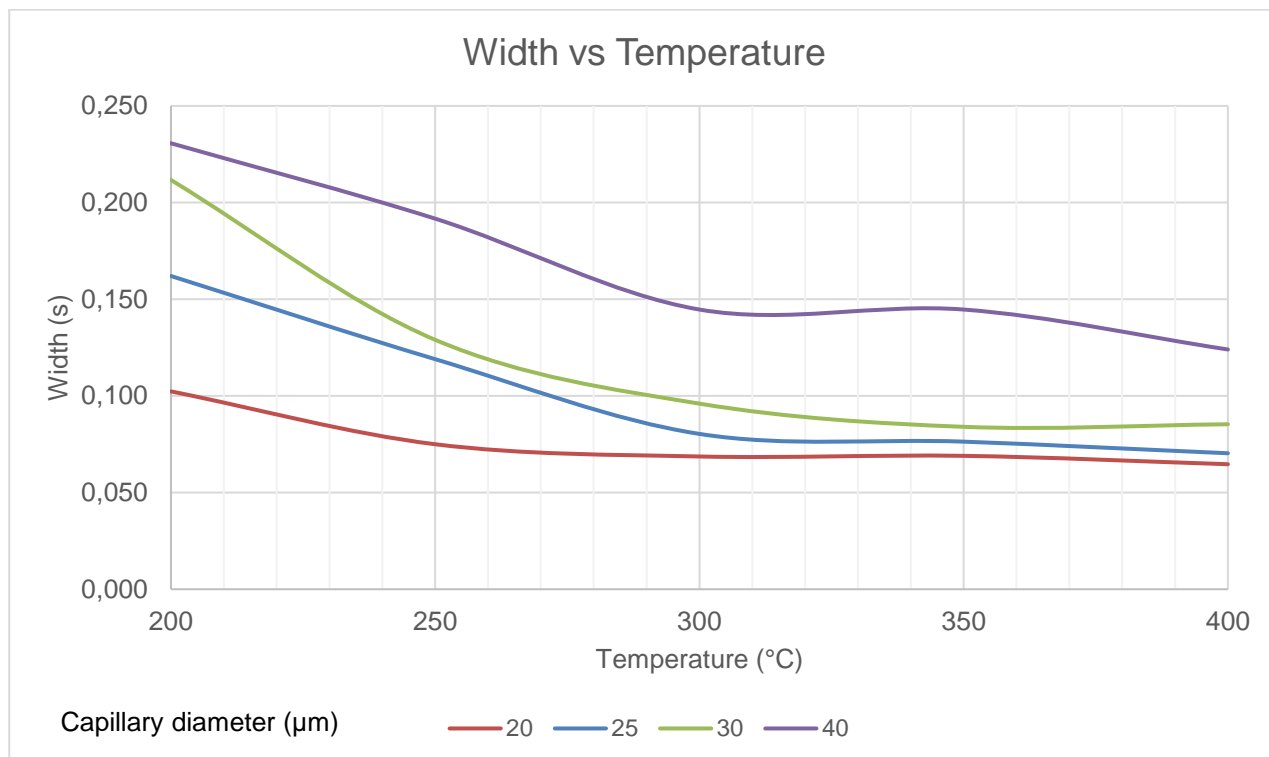


Figura 37. Ampiezza del picco TIC della soluzione di caffeina con diversi diametri di capillare ed a diverse temperature.

Successivamente è stata studiata la posizione del capillare all'interno della camera di vaporizzazione. Gli esperimenti sono stati condotti alle seguenti condizioni:

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O: CH₃CN 50:50 (caffeina) e H₂O:CH₃CN 10:90 (IPA), portata volumetrica 0,4 μL/min, iniettore manuale (10 nL).

Configurazione FIA.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione a 350°C, diametro del capillare: 25 μm.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (m/z: Q 194, 109, 82)

I risultati ottenuti al variare della posizione del capillare con la caffeina sono riportati in Figura 38.

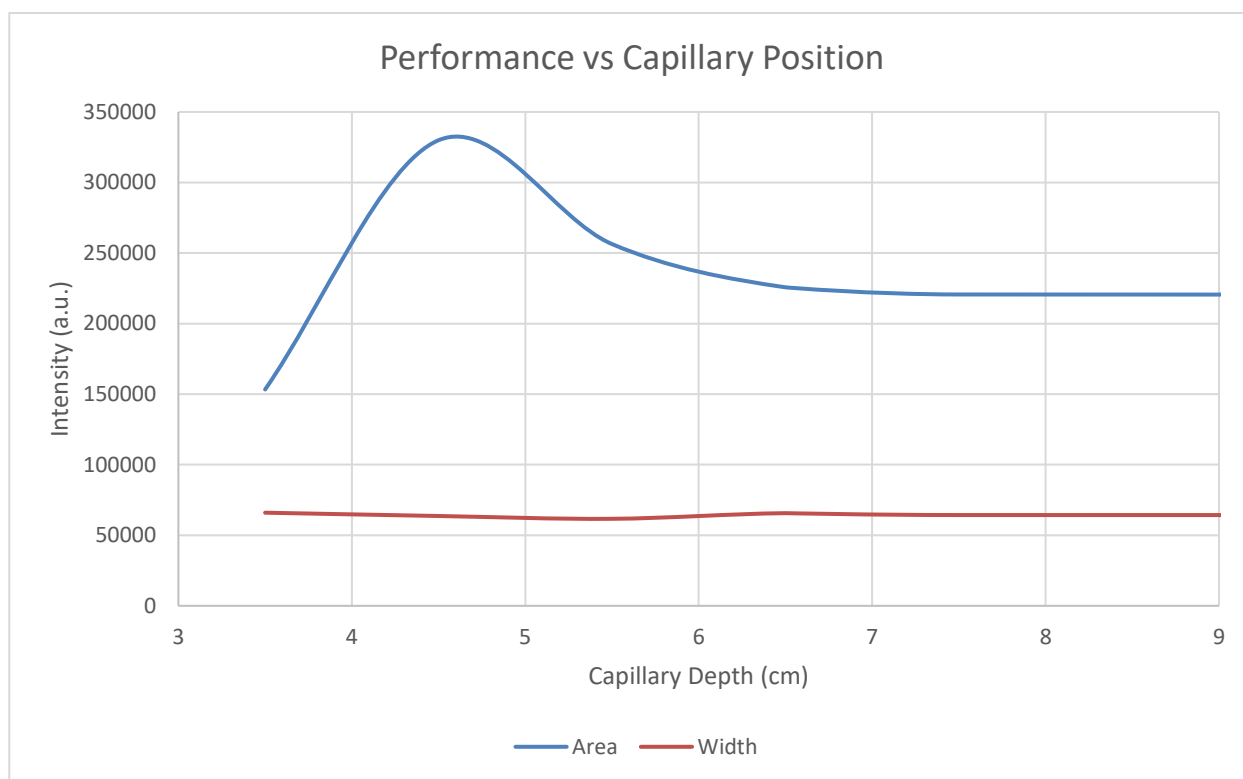


Figura 38. Studio delle prestazioni al variare della posizione del capillare di vaporizzazione.

Dalla Figura 38 emerge come per l'area della caffeina (blu) vi sia un valore di posizione che determina un massimo nella curva; questo corrisponde a 4.5 cm ed è la configurazione per la quale si ottiene la massima efficienza di vaporizzazione. L'altra linea riporta l'andamento dell'ampiezza del picco (rosso) misurata contestualmente alla misura dell'area; è evidente come questa sia pressoché una retta priva di punti di discontinuità e quindi l'ampiezza non è influenzata dalla posizione del capillare. Per la caffeina quindi il picco ha sempre la stessa ampiezza, corrispondente al volume di iniezione, ma diversa area (e quindi altezza) in funzione della posizione.

Un'altra verifica interessante è lo studio della relazione tra segnale e flusso della fase mobile. Considerando che tutti i diametri delle varie parti del sistema LC e dell'interfaccia sono gli stessi, all'aumentare del flusso volumetrico aumenta linearmente anche la sua velocità. A velocità superiori il picco registrato per la stessa banda cromatografica ha un'ampiezza inferiore, risultando meglio profilato. L'altro lato della medaglia è un vuoto meno intenso dovuto al maggior numero di molecole alimentate e maggiori interazioni analita-fase mobile. Gli esperimenti sono stati condotti alle seguenti condizioni:

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O:CH₃CN 50:50, iniettore manuale (10 nL). Configurazione FIA.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione a 350°C, diametro del capillare: 25 µm, posizione impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (m/z: Q 194, 109, 82).

I risultati ottenuti sono riportati in Figura 39.

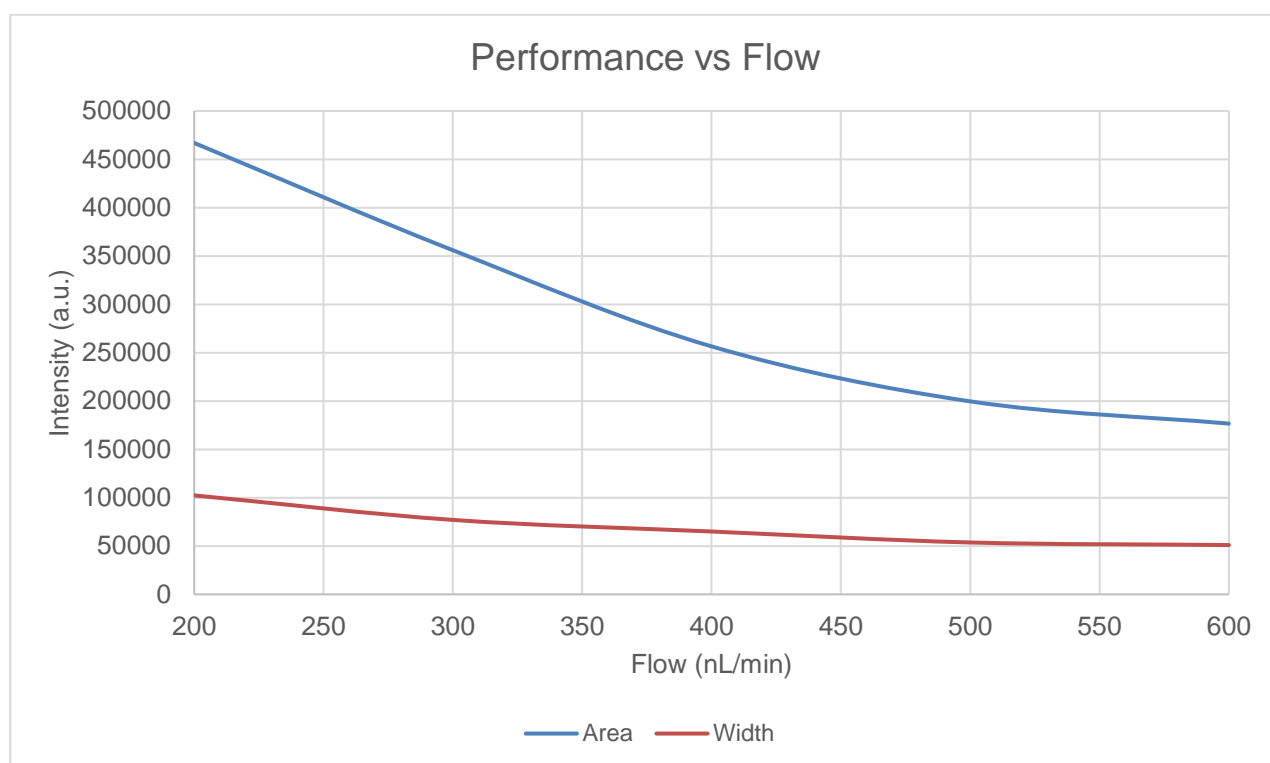


Figura 39. Studio delle prestazioni al variare della portata di fase mobile.

All'aumentare del flusso di fase mobile sia area del picco (blu) che ampiezza (rosso) diminuiscono. Questo risultato è in accordo con quanto previsto in quanto un maggior flusso implica una pressione in sorgente più alta e, con essa, una peggior efficienza di ionizzazione. L'ampiezza del picco va riducendosi grazie al minor tempo necessario per trasferire tutto il volume di iniezione alla sorgente.

In cromatografia liquida a fase inversa si utilizzano solventi polari, spesso di origine organica, e dotati di caratteristiche acido/base. Alcoli e la stessa acqua sono due tipici eluenti HPLC a fase

inversa con protoni debolmente “acidi”. Nell’interfaccia Liquid-El queste molecole sono in fase vapore ed a elevata temperatura, condizioni che enfatizzano la loro reattività; in presenza di analiti con siti basici una parte di queste molecole può ricevere lo ione H^+ e subire quindi ionizzazione chimica. In queste condizioni la frammentazione sarà molto più scarsa e lo ione maggiormente generato sarà lo ione quasi-molecolare $M+H$ con m/z maggiore di un’unità rispetto allo ione molecolare atteso in ionizzazione elettronica. Lo spettro di massa finale risulterà un ibrido tra lo spettro EI e quello CI. Per studiare l’incidenza di questo fenomeno sono stati condotti una serie di esperimenti in cui è stato registrato il rapporto tra lo ione molecolare M e lo ione protonato $M+H$. Le prove sono state condotte con la soluzione standard di caffeina alle condizioni dell’esperimento precedente ma con le seguenti differenze:

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a $280^\circ C$, acquisizione SIM (m/z : Q 195 [$M+H$], 194 [M], 109, 82).

Il risultato degli esperimenti è riportato in Figura 40.

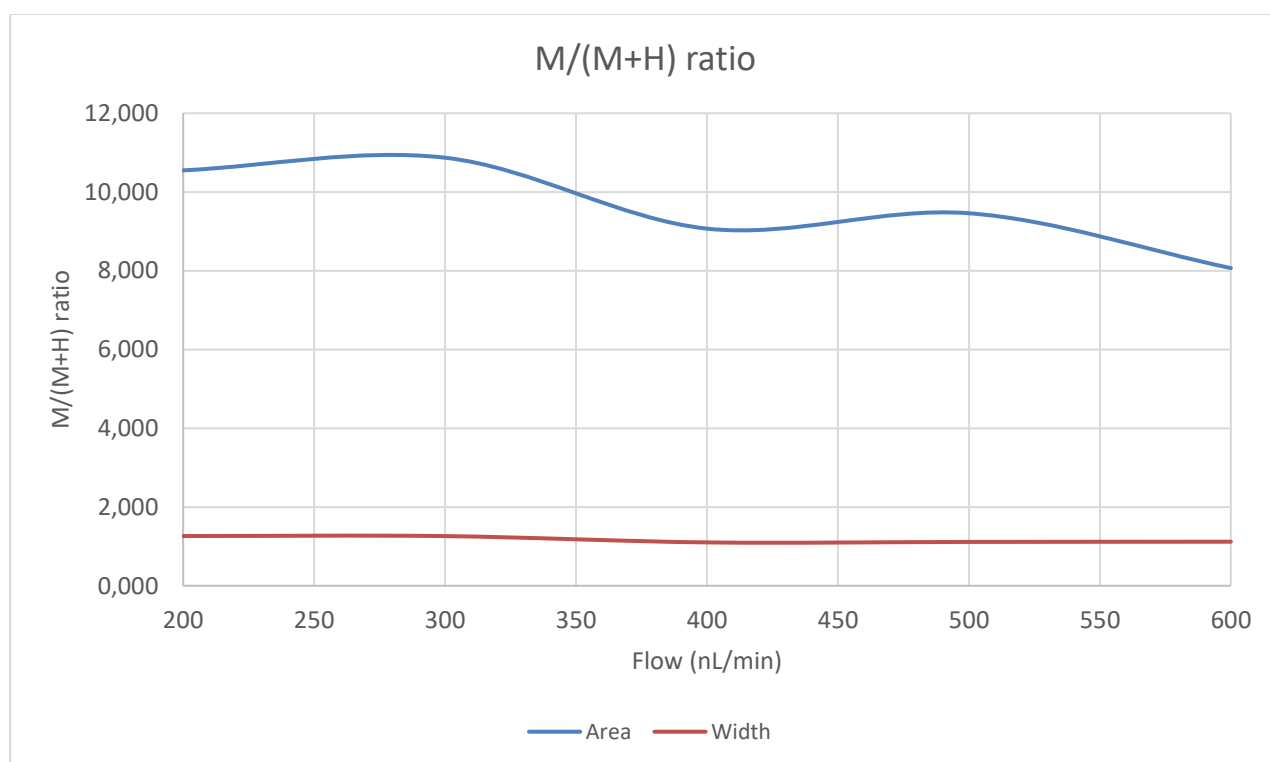


Figura 40. Andamenti del rapporto tra aree e ampiezze dei picchi M ($m/z = 194$) ed $M+H$ ($m/z = 195$).

All’aumentare del flusso si nota come il rapporto tra le aree (blu) dei picchi vada diminuendo mentre il rapporto tra le ampiezze (rosso) non varia. La riduzione del rapporto tra aree indica

come vi sia un graduale aumento dell'incidenza del picco dello ione protonato $M+H$, a conferma della presenza di fenomeni di ionizzazione chimica. Va comunque sottolineato che questo fenomeno è minimo ed anche la sua incidenza in condizioni estreme è limitata. In tutte le condizioni la corrispondenza tra gli spettri registrati con l'interfaccia e gli spettri NIST è ottimale.

La stessa serie di esperimenti condotti con la caffeina è stata ripetuta con la miscela di IPA. In questo caso sono presenti sia composti dalle diverse caratteristiche fisiche: il naftalene è bassobollente mentre indeno(1,2,3-c,d)pirene e dibenzo(a,h)antracene sono entrambi altobollenti. Lo studio dell'effetto della temperatura è stato replicato alle seguenti condizioni:

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa $H_2O:CH_3CN$ 10:90, portata volumetrica 0.4 $\mu L/min$, iniettore manuale (10 nL). Configurazione FIA.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione variabile. diametro del capillare: 25 μm , posizione impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (m/z : 128, 276, 278).

I risultati ottenuti al variare della temperatura con gli IPA sono riportati in Figura 41. In questo esperimento emergono le differenze date dalle diverse proprietà fisiche degli analiti; il naftalene dà un segnale di area circa costante, mentre per i due composti altobollenti l'area aumenta all'incrementare della temperatura (circa 350°C) fino al raggiungimento di un plateau. Questo andamento si rispecchia anche nelle ampiezze dei picchi (Figura 42).

Il naftalene genera un picco sempre della stessa ampiezza (ed anche area da quanto osservato in precedenza); la vaporizzazione di questo analita ha la stessa efficienza a tutte le temperature studiate. Indeno(1,2,3-c,d)pirene e dibenzo(a,h)antracene vedono l'ampiezza dei relativi picchi ridursi all'aumentare della temperatura; questo comportamento, combinato con il contestuale aumento dell'area indica un miglioramento del passaggio di stato. I valori registrati al di sotto dei 250°C sono poco affidabili in quanto in queste condizioni il passaggio di stato risulta incompleto.

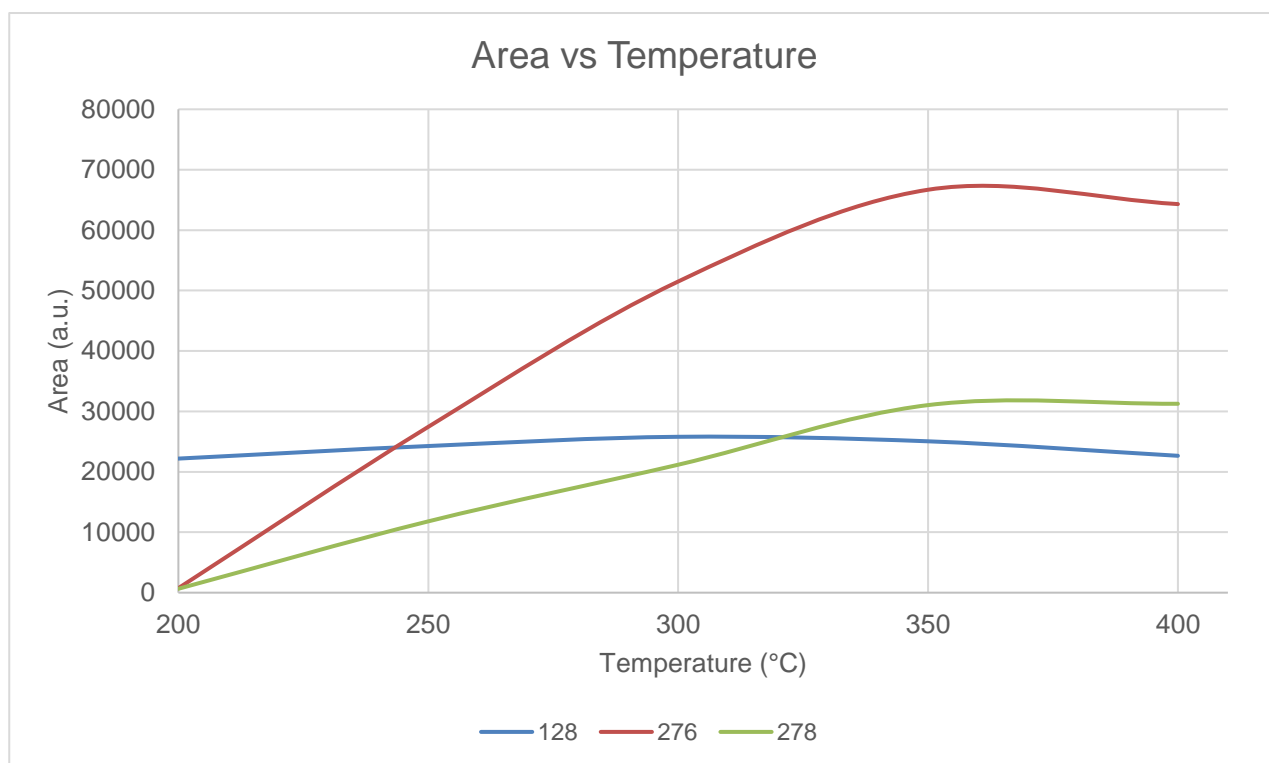


Figura 41. Andamento dell'area dei 3 IPA all'aumentare della temperatura.

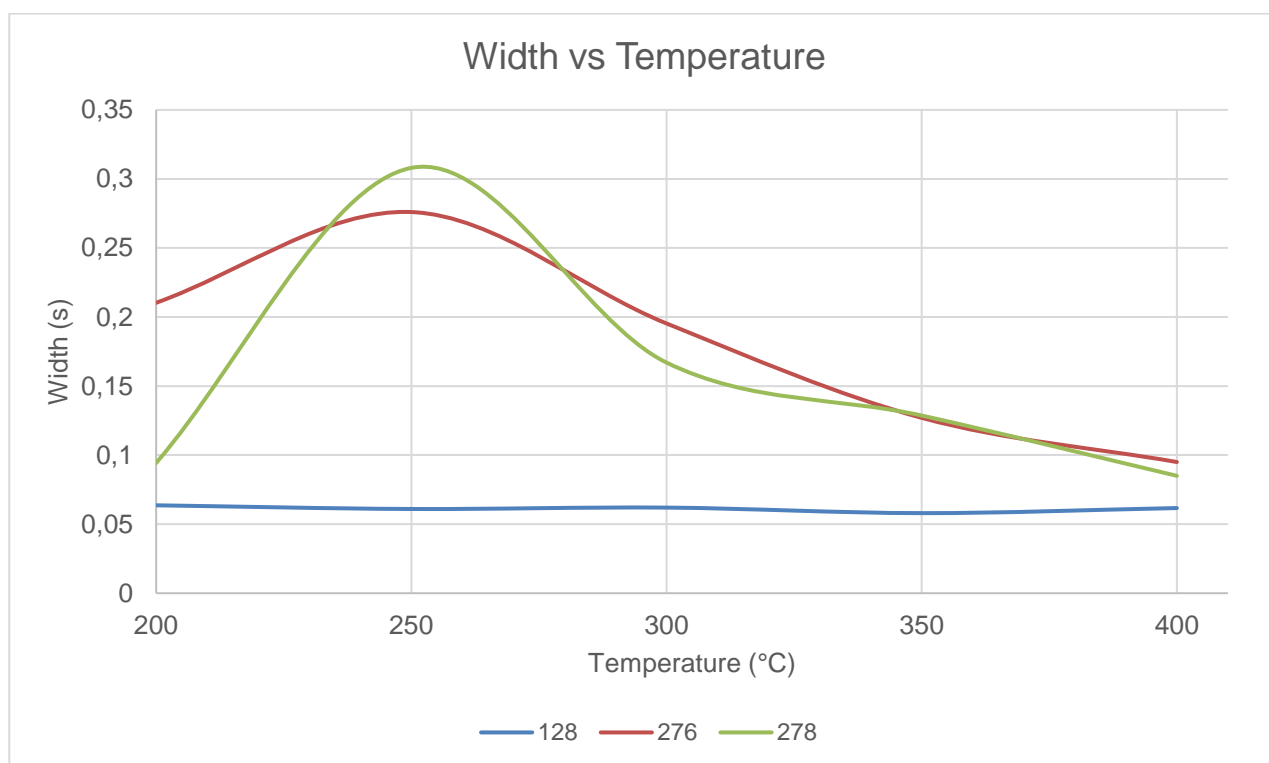


Figura 42. Andamento dell'ampiezza dei picchi dei 3 IPA all'aumentare della temperatura.

Come per la caffeina, anche per la miscela di IPA è stata studiata l'incidenza della posizione del capillare; in questo caso le condizioni sperimentali sono state le seguenti.

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O:CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL). Configurazione FIA.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione variabile. diametro del capillare: 25 µm, posizione impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (m/z: 128, 276, 278).

L'esperimento svolto con la miscela di IPA mostra un comportamento formalmente uguale alla caffeina ma spostato a maggior profondità (Figura 43).

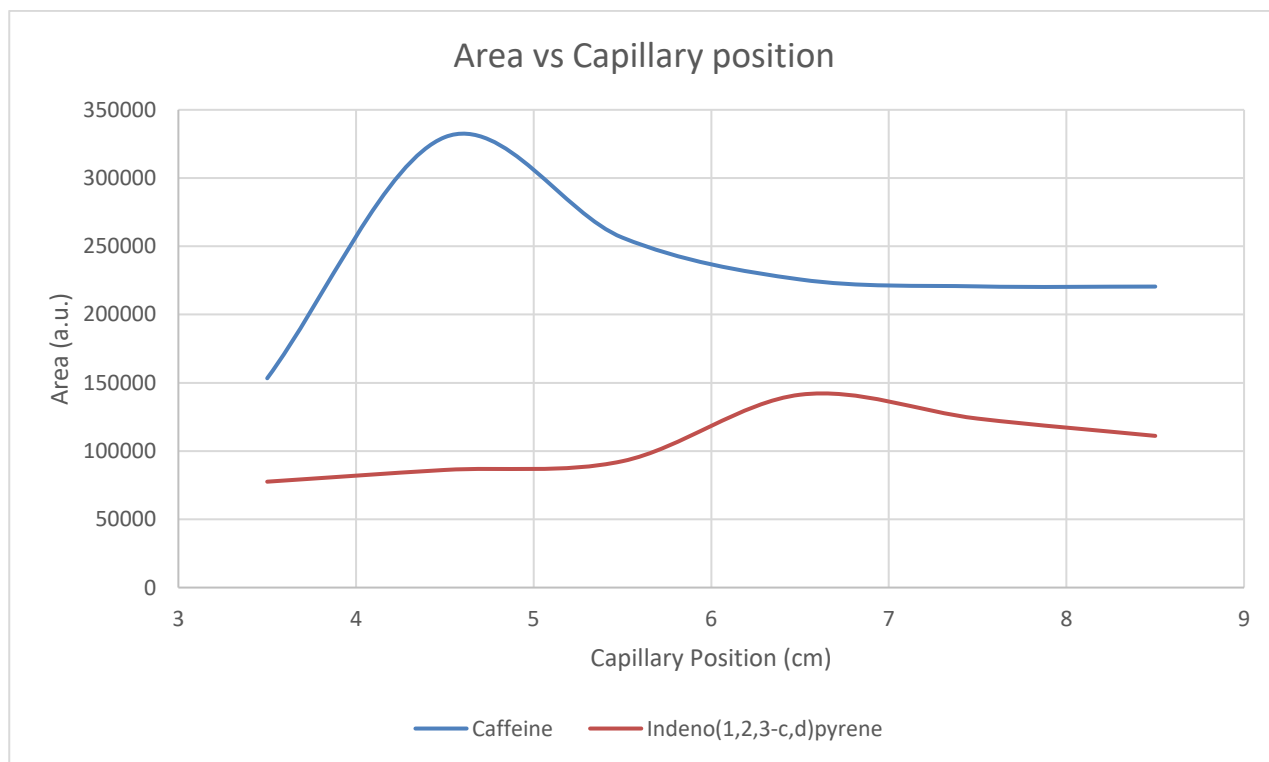


Figura 43. Area dei segnali di caffeina e indeno(1,2,3-c,d)pirene in funzione della posizione del capillare.

Focalizzando l'attenzione sui composti più pesanti come l'indeno(1,2,3-c,d)pirene si nota come la curva che descrive la relazione tra area e posizione del capillare è spostata rispetto alla caffeina verso maggiori profondità (Figura 39). Questo risultato è in accordo con quanto atteso in quanto

questo idrocarburo ha una temperatura di ebollizione di oltre 300°C superiore rispetto a quella di sublimazione della caffeina e, quindi, richiede temperatura maggiore e vuoto più intenso.

Al netto delle prove presentate sono stati individuati dei parametri ottimali generici per il funzionamento dell'interfaccia Liquid-El; per la messa a punto "di fino" sono sufficienti dei piccoli accorgimenti, soprattutto in termini di posizione del capillare, in funzione dell'analita e della matrice. Il diametro interno ottimale del capillare è stato individuato in 25 – 30 µm, posizionato tra 4 e 6 cm all'interno della camera di vaporizzazione. Il flusso ottimale è nell'intervallo 300 – 500 nL/min, anch'esso compreso tra valori intermedi rispetto a quelli studiati. Parametri come portata dell'elio e composizione della fase mobile sono stati investigati ma la loro incidenza è risultata essere ininfluente ai fini delle prestazioni strumentali.

Con la conoscenza dell'interfaccia sviluppata durante la sua messa a punto, vari esperimenti sono stati condotti per verificare le prestazioni in configurazioni diverse e con altri analiti. Prima di tutto è stata verificata la corrispondenza tra gli spettri EI registrati con l'interfaccia e quelli presenti nella libreria NIST. Questi esperimenti sono stati condotti alle seguenti condizioni utilizzando soluzioni standard a 100 µg/mL in CH₃CN dei vari composti.

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O: CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL). Configurazione FIA.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 350°C. Diametro del capillare: 25 µm, posizione impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione scan (m/z: 60 → 500, threshold: 10, sample: 4).

La corrispondenza tra gli spettri acquisiti con l'interfaccia e la libreria NIST misurata dal software Chemstation® MSD è riportata in Tabella 4.

Dalla tabella emerge l'ottima capacità dello spettrometro dotato di interfaccia di riconoscere composti incogniti attraverso la comparazione con la libreria NIST e senza dover ricorrere a tempo di ritenzione o ad esperimenti di massa tandem come nei comuni approcci elettrospray LC-MS o senza dover estrarre gli analiti per iniezioni GC-EI-MS. Questo enorme potenziale fa del Liquid-El uno strumento formidabile per gli approcci *untargeted*. Il risultato acquisisce ancora più rilevanza al netto del fatto che non è stato possibile sottrarre il fondo senza separazione, e quindi le

percentuali di riconoscimento avrebbero potute essere ben più elevate. In questa configurazione è però possibile caratterizzare la molecola istantaneamente, senza i tempi della cromatografia; questo fattore è stato di ispirazione per un'interessante applicazione che sarà descritta nelle prossime pagine.

Compound	Probability (%)
Sylvex	77,5
MCPB	94,3
Acetamiprid	92,9
Zoxamide	94,9
Mestranol	86,8
Imazil	98,2
Endosulfan	99,3

Tabella 4. Corrispondenza tra spettro registrato e libreria NIST per composti analizzati con il Liquid-El in scan.

Gli esperimenti in FIA sono stati fondamentali per ottimizzare l'interfaccia ed il suo funzionamento nel minor tempo possibile, ma non sono rappresentativi delle condizioni per cui il Liquid-El è stato progettato per lavorare.

Per valutare le prestazioni dell'interfaccia in configurazione LC-MS comprensiva di cromatografia è stato impostato un esperimento basato sull'analisi in SIM di una miscela 200 µg/mL in CH₃CN di *Persistent Organic Pollutants (POP)*, ovvero delle molecole inquinanti e fortemente tossiche a lenta cinetica di decomposizione.

Strumento UHPLC: Thermo Scientific Dionex RSLC 3100, eluizione a gradiente (0 - 100% CH₃CN:H₂O in 20 min + 5 min isocratica 100% CH₃CN), portata volumetrica 0.4 µL/min, volume di iniezione 100 nL con iniezione manuale. Colonna: Waters Acquity C18 1.7µm x 75mm.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 400°C. Diametro del capillare: 25 µm, posizione impostata a 5,5 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C. Acquisizione SIM.

Gruppo 1 (t_r 0 → 20 min):

- Acetamiprid (m/z 152), t_r = 12 min
- Thiram (m/z 88), t_r = 15 min
- BPA (m/z 213) t_r = 16 min
- Captan (m/z 149), t_r = 18 min
- Phosmet (m/z 160) = t_r 18 min e 30 s
- Fluodioxonyl (m/z 248), t_r = 18 min e 50 s
- Phenexamide (m/z 97), t_r = 19 min
- Boscalid (m/z 140), t_r = 19 min e 10 s
- Naphtalene (m/z 128) = 19 min e 40 s

Gruppo 2 (t_r 20 → 25 min):

- Chlorphenvifos (m/z 267), t_r = 20 min e 50 s
- Lindane (m/z 181), t_r = 21 min
- Anthracene (m/z 187), t_r = 22 min
- Zoxamide (m/z 178), t_r = 23 min

Gruppo 3 (t_r 25 → 30 min):

- Pyriproxiphen (m/z 136), t_r = 24 min e 10 s
- Imazalil (m/z 215), t_r = 24 min e 50 s
- Chlorpyriphos (m/z 197), t_r = 25 min
- 4-Octylphenol (m/z 107), t_r = 26 min e 20 s
- Benzo(a)pyrene (m/z 252), t_r = 27 min
- Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (m/z 276), t_r = 28 min
- Endosulfan (m/z 339) = 29 min

Il cromatogramma LC-MS acquisito in EI con l'interfaccia Liquid-EI è riportato in Figura 44. Al di là della prestazione cromatografica in quanto tale, che non è stata ottimizzata in quanto l'esperimento riportato è un semplice "esercizio di stile", si nota la buona qualità dei picchi ed un rumore di fondo accettabile. La "codatura" dei picchi (*tailing*) è ragionevolmente attribuibile all'elevata quantità iniettata (20 ng a composto). Il profilo disegnato dal fondo è imputabile al cambio di composizione della fase mobile e del tutto normale. Alcuni picchi di composti indicati nel programma non sono visibili nel cromatogramma TIC in quanto poco intensi; la loro presenza è stata confermata nell'estrazione degli ioni durante l'elaborazione dei dati.

Il cromatogramma registrato risulta di buona qualità e quindi permetterebbe all'interfaccia di essere applicata, insieme allo spettrometro di massa, come detector in un'applicazione reale con tanto di quantificazione.

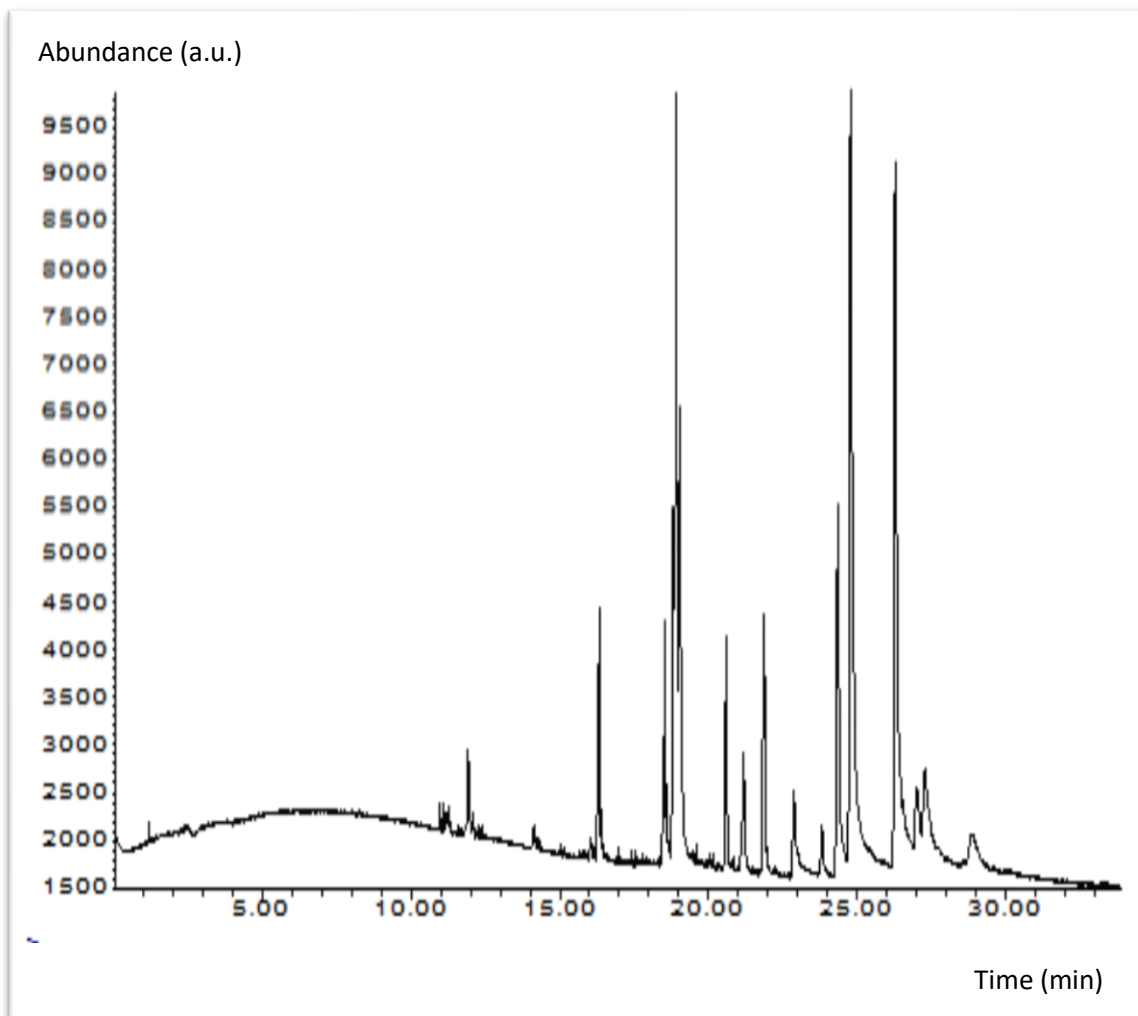


Figura 44. Primo esperimento cromatografico acquisito in LC-MS con il Liquid-El; i composti sono eluiti nell'ordine riportato nel programma di acquisizione.

Nel suo primo prototipo l'interfaccia Liquid-El ha dimostrato di poter funzionare correttamente ed anche di dare ottime prestazioni con diversi analiti se regolata a dovere. Se da un lato il funzionamento e le prestazioni hanno superato le previsioni, dall'altro l'affidabilità restava quella di un prototipo, ovvero, instabile. L'iniezione di soluzioni standard, infatti, garantisce che tutto il volume di iniezione sia dato da molecole volatili ed inerti; questo aspetto non necessariamente è valido anche per campioni reali, dove particelle solide, polimeri e composti altobollenti possono

essere presenti e precipitare all'uscita del capillare, imbrattandolo o addirittura occludendolo, come nel Direct-EI. Un esempio di imbrattamento del capillare dopo oltre un mese di uso con la miscela di IPA è riportata in Figura 45.

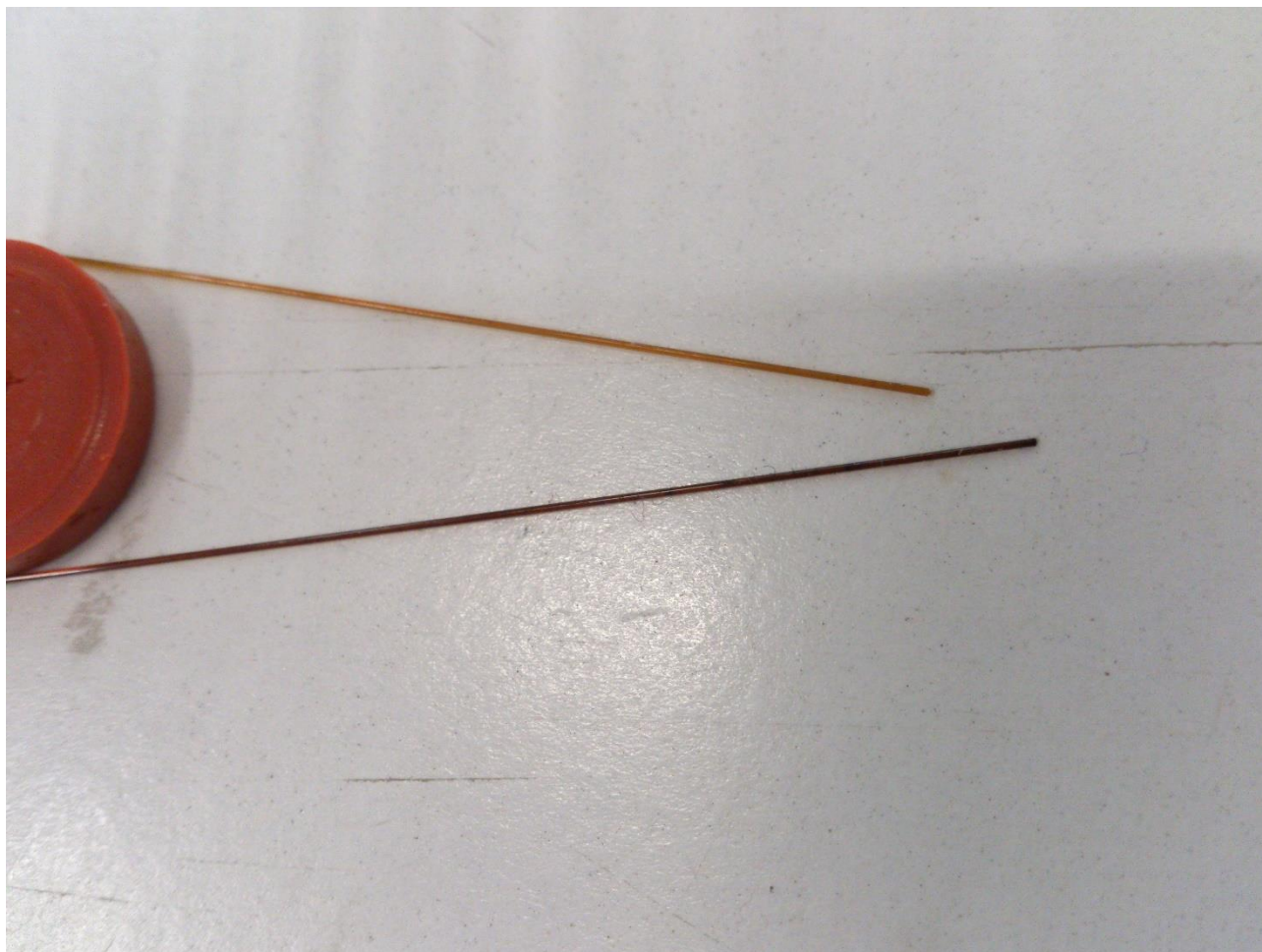


Figura 45. Comparativa tra un capillare nuovo (sopra) ed un capillare usato per un mese con la miscela di IPA.

Inoltre, la pulizia della camera di vaporizzazione risulta difficile a causa del suo ridotto diametro interno. La sola procedura fattibile è basata sull'uso di uno spago impregnato di una sospensione di acqua e polvere di allumina come *polish*; questo metodo non permette di rimuovere con efficacia i residui prodotti nella parte centrale e risulta quindi inadatta allo scopo. Il metallo di cui è fatta la camera di vaporizzazione è una lega di ferro basata sulla composizione dell'acciaio dolce, ma additivata con ridotte quantità di altri metalli. Questi atomi, a temperature di oltre 350°C ed in presenza degli analiti in fase vapore potrebbero dare attività catalitica, trasformando parte delle molecole in composti diversi. Complice la rugosità interna della camera di vaporizzazione, l'area superficiale esposta non è trascurabile e potrebbe enfatizzare il fenomeno di cui sopra; va

sottolineato che questo ragionamento è solo una possibilità, e che nell'attività sperimentale, con le poche molecole analizzate, non è stato osservato nessun fenomeno catalitico.

Al netto dei limiti congeniti all'interfaccia elencati in precedenza è stato necessario pensare ad un upgrade strutturale del Liquid-El prima di proseguire con gli esperimenti.

SECONDO PROTOTIPO

La miglior soluzione in grado di promuovere la vaporizzazione sulla superficie metallica della camera di vaporizzazione è quella di ricoprirne la superficie interna con un qualche materiale inerte adatto allo scopo. Partendo dall'esperienza cumulata con l'inertizzazione della sorgente studiata in progetti di ricerca precedenti (134), sulla parte interna della camera di vaporizzazione è stato applicato un film di materiale ceramico e depositato come indicato dal produttore (Figura 46).



Figura 46. Deposizione del coating ceramico dentro la camera di vaporizzazione.

Il coating in questione è il Non-stick ceramic di ILAG Industrielack AG ed è un prodotto privo di PTFE e PFOA a base completamente inorganica impiegato per la copertura antiaderente di padelle e pentole. L'uso di camere di vaporizzazione ricoperte con questo coating ha però dato risultati deludenti sotto tutti i punti di vista; questo risultato è stato ragionevolmente attribuito alla difficoltà di ricoprire in maniera capillare ed omogenea tutta la superficie interna di un tubo lungo

circa 17 cm e con diametro di 1 mm. La verifica della qualità del trattamento è stata fatta anche su una pipetta Pasteur ed il risultato supporta ampiamente l'ipotesi proposta (Figura 47).

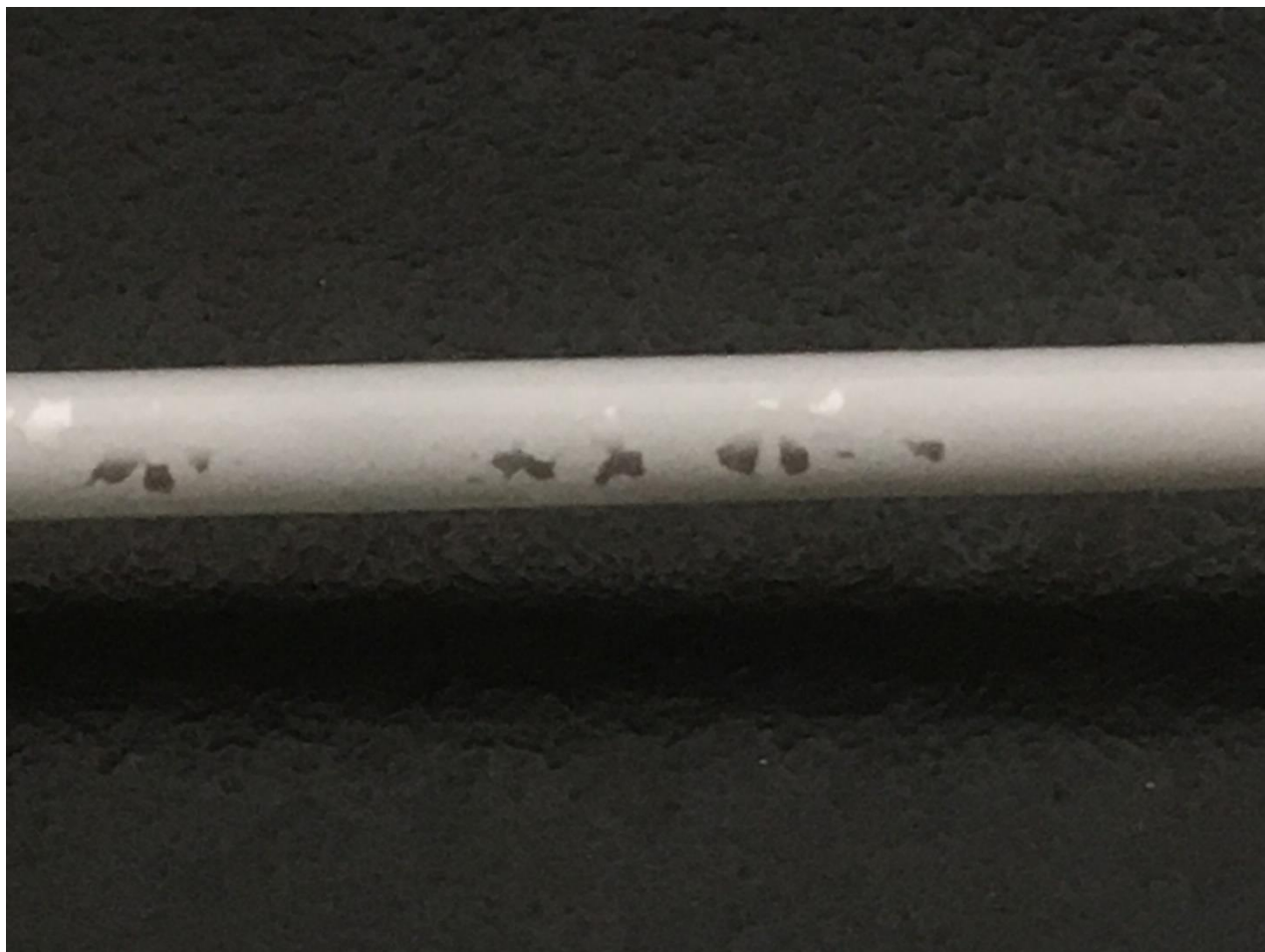


Figura 47. Sezione del corpo di una pipetta Pasteur ricoperta all'interno con il coating ceramico.

Alternativamente al coating ceramico si è pensato di inserire un liner all'interno della camera di vaporizzazione; questo tubicino deve interporarsi tra il capillare e metallo, andando ad agire da superficie di vaporizzazione. Tra i materiali idonei per lo scopo la scelta è ricaduta su un capillare in silice fusa ricoperto all'esterno di polimide esattamente come i capillari usati per il trasferimento del liquido nell'interfaccia. Tra i vari componenti commerciali disponibili la miglior dimensione è stata trovata in un capillare dal diametro esterno di 795 μm ed interno da 400 μm ; considerando che all'interno del liner deve entrare il capillare proveniente dal cromatografo liquido e che questo ha un diametro esterno di 375 μm , risulta chiaro che non vi è spazio per il passaggio ottimale dell'elio. Per poter permettere l'uso del liner è stato quindi necessario uno adeguamento dell'interfaccia con la sostituzione del capillare con uno dal diametro esterno di 150 μm ; in questo

modo tra i due componenti vi è lo spazio ottimale per il passaggio del gas a velocità compatibili al funzionamento dell'interfaccia. Grazie al suo ridotto diametro interno, la camera di vaporizzazione è stata rinominata come *vaporization micro-channel* (Figura 48).

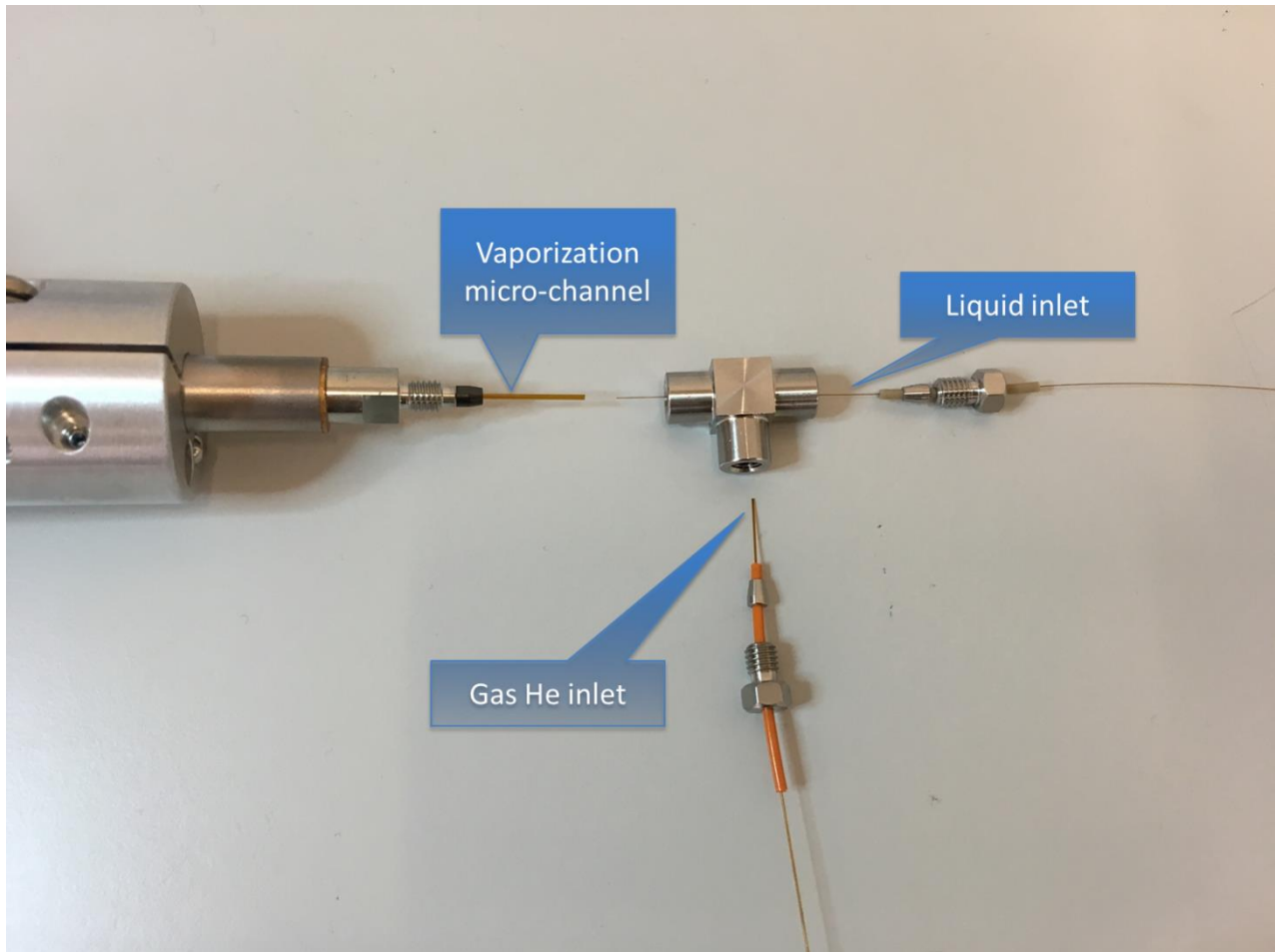


Figura 48. Dettaglio del punto sommatore dell'interfaccia dotata di liner e di capillare da 150 μm .

I vantaggi legati all'uso del liner a copertura del metallo sono numerosi:

- Le operazioni di manutenzione dell'interfaccia sono azzerate in quanto è sufficiente rimuovere il liner sporco e sostituirlo con uno nuovo.
- A parità di portate volumetriche la riduzione del diametro interno della camera di vaporizzazione determina un importante aumento della velocità del flusso dei gas. Grazie a questo aspetto si riescono ad ottenere picchi più stretti senza dover incrementare la portata con le conseguenti perdite di area riportate negli studi preliminari (Figura 39-40).

- Il flusso delle molecole vaporizzate si muove spinto dall'elio, gas inerte, a contatto con la silice fusa, materiale inerte. In queste condizioni qualsiasi tipo di reazione di degradazione indotta dalla temperatura viene resa improbabile.

Nonostante i notevoli miglioramenti ottenuti grazie all'implementazione della vaporization micro-channel, il problema della periodica occlusione del capillare resta ancora irrisolto. Questo fenomeno, che come già suggerito si presenta maggiormente con miscele di matrici complesse e composti altobollenti, è dovuto alla precipitazione di composti non vaporizzati (Figura 49).

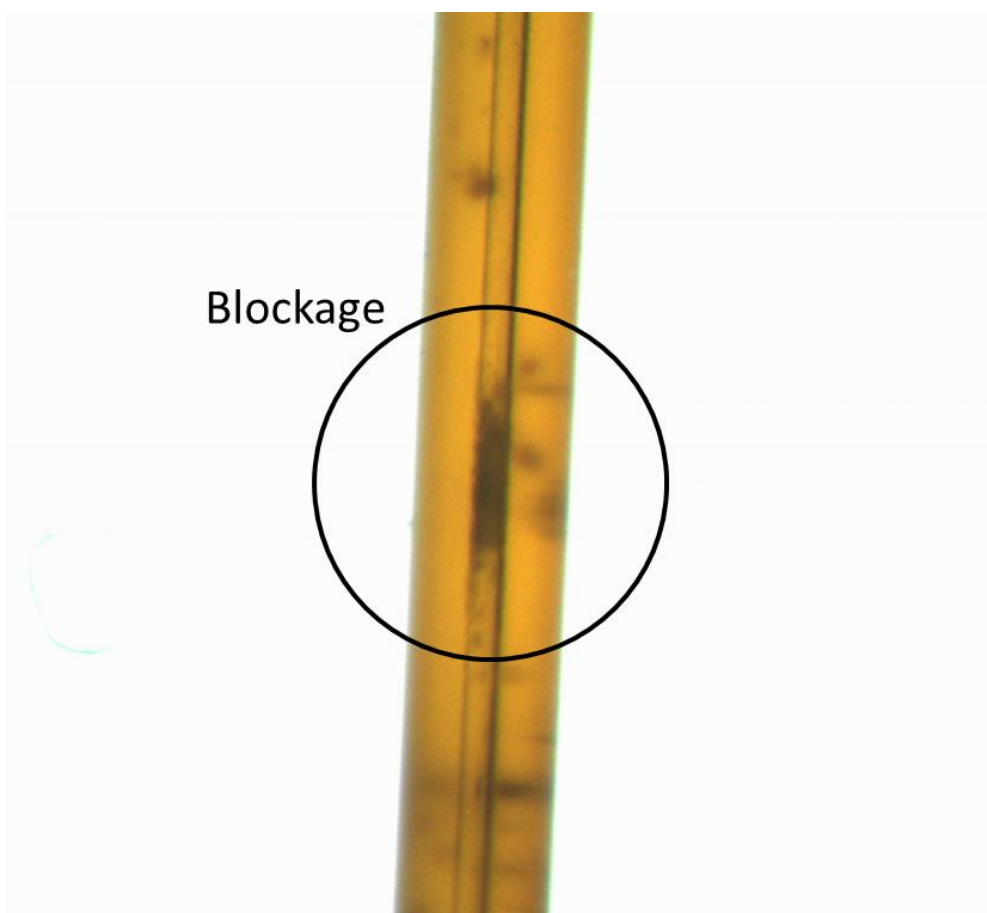


Figura 49. Fotografia controluce di un capillare occluso a causa della vaporizzazione precoce della fase mobile.

Studiando la distribuzione della temperatura con una termocamera risulta evidente come anche la parte esterna al manicotto riscaldante della camera di vaporizzazione raggiunga elevate temperature. Per questi esperimenti è stata impiegata una termocamera Flir E5 dotata di cavalletto. Impostando l'interfaccia a 350°C, ad esempio, la temperatura del punto sommatore

letta dalla termocamera raggiunge circa 100°C nel lato connesso alla camera di vaporizzazione, e 85°C nel lato connesso all'ingresso del liquido (Figura 50).

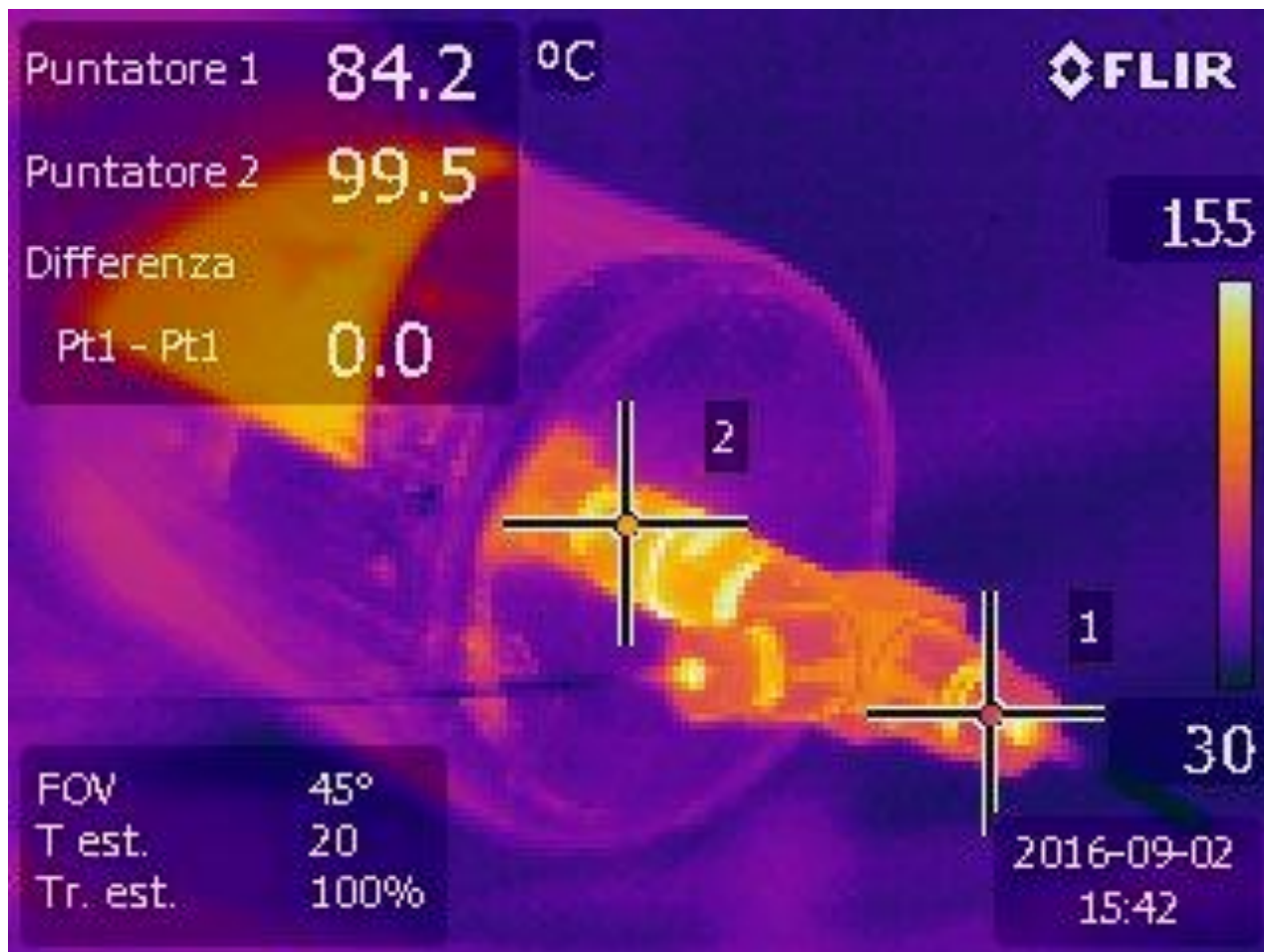


Figura 50. Distribuzione della temperatura nell'interfaccia impostata a 350°C.

Studiando l'immagine con più attenzione ci si può rendere conto che, nella parte di filettatura scoperta compresa tra il punto sommatore e la camera di vaporizzazione, la temperatura raggiunge il suo massimo ovvero oltre 150°C come da scala di colore riportata a destra. Se quanto detto vale per l'esterno è ragionevole pensare che all'interno, dove non c'è contatto con l'aria a temperatura ambiente, si raggiungano valori ancora più elevati. Il punto sommatore è una parte del sistema per il quale non è previsto il riscaldamento in quanto il passaggio di stato, unico step energivoro, deve aver luogo solo all'interno della parte calda. Lavorando in queste condizioni, anche nel punto sommatore la temperatura raggiunge valori al di sopra del punto di ebollizione dei solventi da cromatografia liquida, e quindi la transizione di fase può iniziare ben prima rispetto all'uscita del capillare. Passaggio di stato che, a causa di una temperatura minore di circa 200°C

rispetto a quella impostata, riguarda la fase mobile, gli analiti a basso punto di ebollizione, ma non gli altobollenti, che si solidificano e determinano il problema di cui in precedenza.

La soluzione migliore per evitare l'occlusione del capillare è quella di far sì che la vaporizzazione di tutte le molecole avvenga solo nell'intorno dell'uscita del capillare, unica parte dell'interfaccia nella quale il liquido dovrebbe ricevere calore. Il punto sommatore deve quindi restare a condizioni più prossime possibile a quelle ambientali. Si è pensato quindi di installare un dispositivo refrigerante in grado di raffreddarlo ai valori di temperatura desiderati ed il dispositivo ideale è stata identificato nella cella di Peltier.

La cella di Peltier è un sistema termoelettrico basato su un "sandwich" di due superfici dielettriche termicamente conduttrici all'interno delle quali vi sono due materiali drogati P ed N collegati tra loro attraverso una lamella in rame. Applicando una tensione positiva al materiale drogato N ed una negativa al drogato P, si ha per effetto *Seebeck* il riscaldamento di un lato ed il raffreddamento dell'altro (Figura 51).

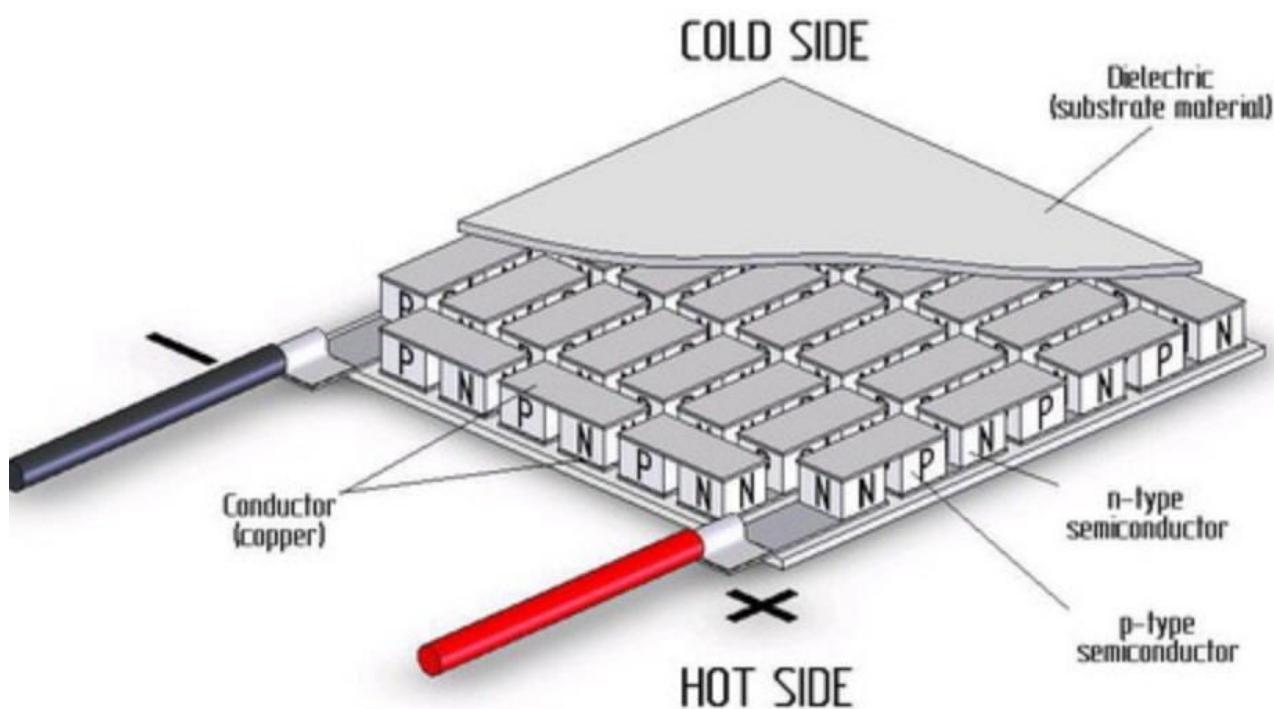


Figura 51. Rappresentazione schematica della sezione di una cella di Peltier (135).

Applicando il lato freddo alla superficie del punto sommatore la cella di Peltier si comporta come una pompa di calore, andando a trasferire l'entalpia al lato caldo; qui un dissipatore in alluminio

per microprocessori massimizza la superficie esposta all'aria attraverso cui il calore può essere smaltito. Per massimizzare l'efficienza del processo nella sua globalità, una ventola motorizzata viene applicata lateralmente al dissipatore, in modo da forzare il passaggio dell'aria attraverso le alette. Tutti i dispositivi sono connessi ad un alimentatore da 12 V, 30 W dotato di interruttore; l'avviamento della cella di Peltier e della ventola avviene contemporaneamente. Le superfici dedite allo scambio di calore sono ricoperte di un'apposita pasta termica comunemente utilizzata per gli stessi scopi all'interno dei computer desktop. La configurazione del suddetto sistema di raffreddamento è riportata in Figura 52.

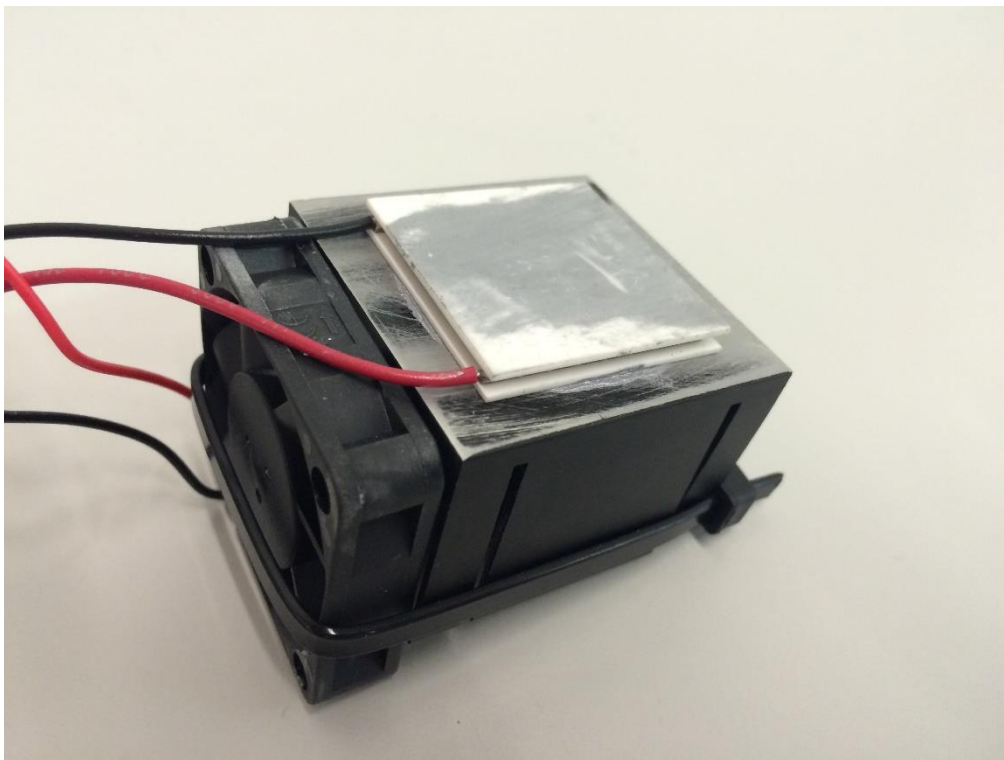


Figura 52. Cella di Peltier rivolta col lato freddo in alto e con il dissipatore sul lato caldo; lateralmente e disposta perpendicolare rispetto al sistema è presente la ventola.

Nel caso di quest'applicazione sono state studiate diversi modelli di cella di Peltier, gran parte dei quali è stata scartata a causa della loro scarsa affidabilità in un impiego così gravoso. Il modello selezionato è dotato delle seguenti caratteristiche:

- Massima Potenza refrigerante: 37.9 W
- Massima differenza di temperatura tra i due lati: + 74 °K
- Massima intensità di corrente: 3.9 A
- Massimo voltaggio: 15.7 V

- Superficie attiva: 30 x 30 mm
- Spessore della lamella di ceramica: 3.6 mm

Per il monitoraggio della temperatura operativa del punto sommatore, una termocoppia viene posizionata a contatto con la sua superficie metallica laterale, in modo da leggere un valore intermedio tra il lato refrigerato e quello opposto. Il sistema, nella sua totalità, applicato all'interfaccia si presenta come in Figura 53.

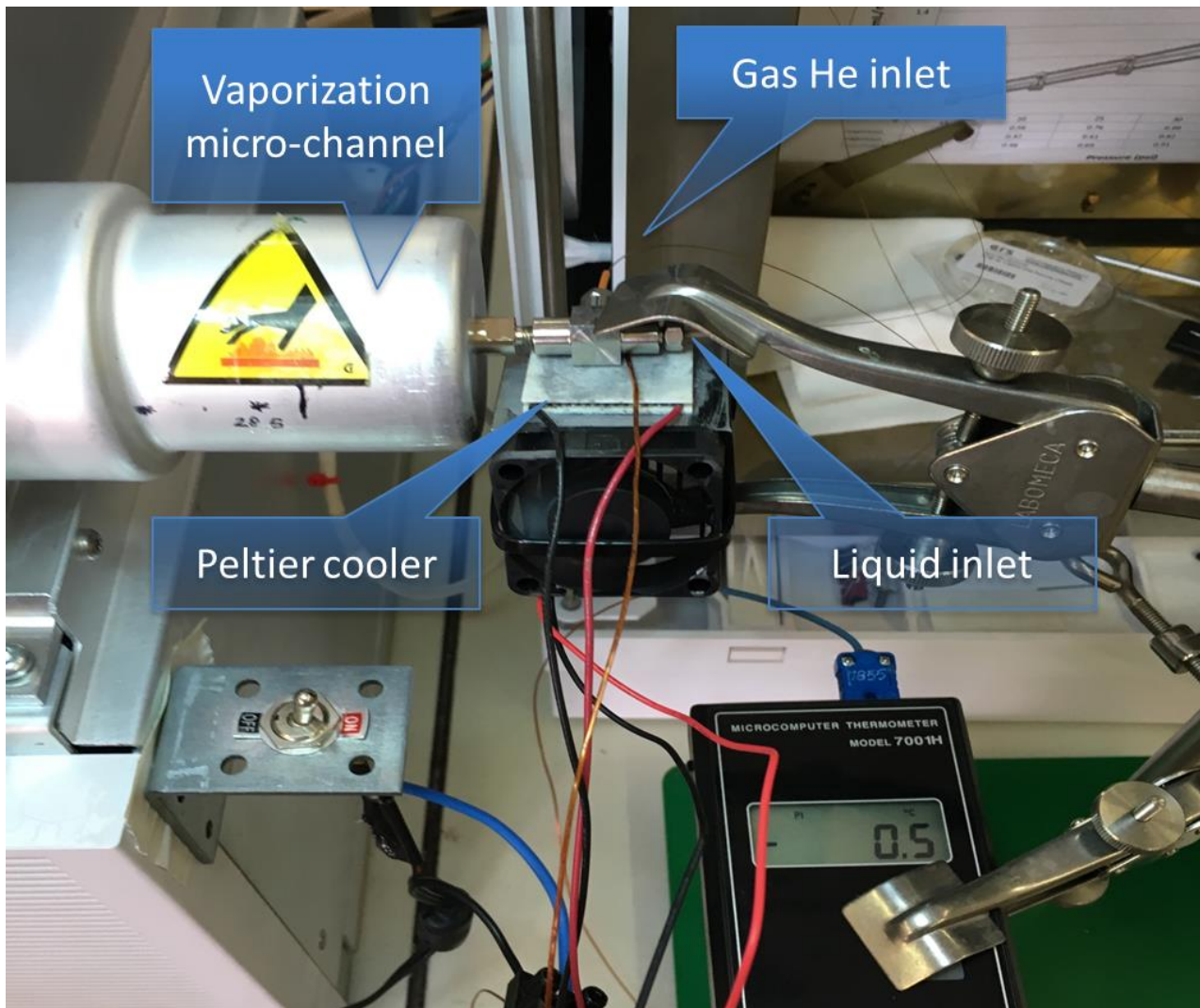


Figura 53. Interfaccia Liquid-El dotata di sistema di raffreddamento con cella di Peltier.

Il raffreddamento dovuto alla cella di Peltier è stato misurato online con la termocoppia in modo da monitorare la temperatura del punto sommatore durante l'operatività; questa misura è di tipo puntuale e quindi non riesce ad essere rappresentativa di tutta la superficie. Per meglio

comprendere la distribuzione della temperatura sono state scattate delle foto con la termocamera prima e dopo l'accensione della cella di Peltier sull'interfaccia impostata a 350°C (Figura 54-a/b).

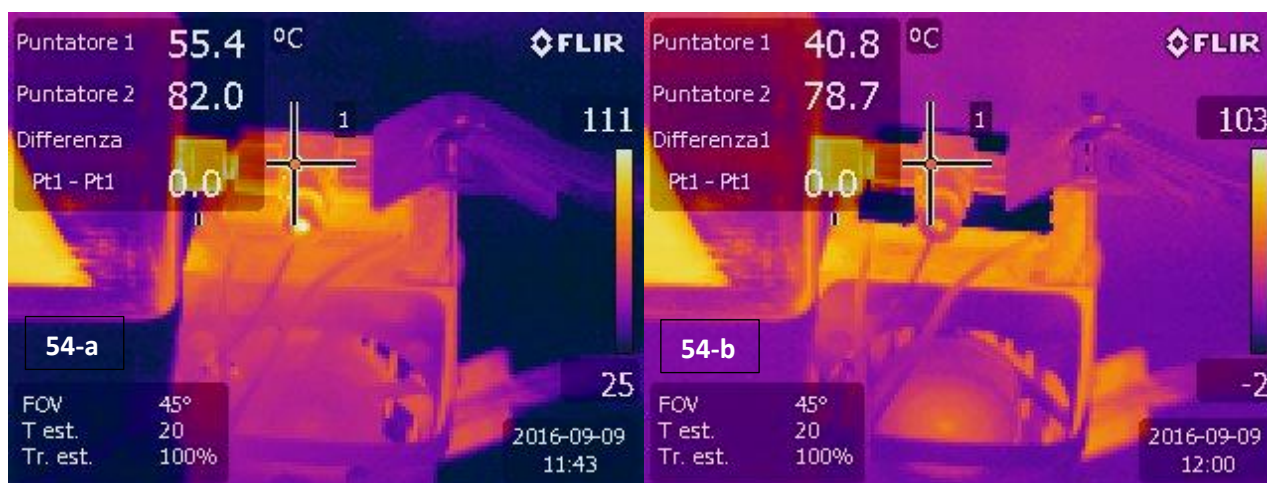


Figura 54. Immagine termica della distribuzione della temperatura sull'interfaccia impostata a 350°C con la cella di Peltier spenta (54-a) e accesa (54-b). Il puntatore 1 è fissato sulla parte centrale della connessione, mentre il 2 è posizionato sulla porzione di vaporization micro-channel che esce.

Con la termocamera fissata con il cavalletto è possibile apprezzare l'effetto del raffreddamento in maniera puntuale. Tra la misura a cella accesa e cella spenta sono stati fatti passare oltre 15 minuti in modo da raggiungere l'equilibrio (certificati dalla casella in basso a destra nelle foto). Il puntatore 1 registra per la parte centrale del punto sommatore una diminuzione della temperatura di circa 15°C, mentre il puntatore 2 mostra che solo 3°C sono diminuiti all'imbocco della vaporization micro-channel. Basandosi sulla scala cromatica emerge come la cella raggiunga vari gradi sotto lo zero sul lato freddo, a dimostrazione del suo corretto funzionamento; nella pratica reale, dopo un'ora di utilizzo si ha addirittura la formazione di ghiaccio. Nonostante questa elevata efficienza la riduzione di temperatura nel punto sommatore è, si buona, ma non eccezionale. Comunque, a 40°C come misurato, anche il più bassobollente dei solventi da cromatografia liquida (il metanolo, $t_{eb} = 64.8^{\circ}\text{C}$) è liquido (136).

Il sistema aggiornato con la vaporization micro-channel dotata di liner, e della cella di Peltier, è il secondo prototipo del Liquid-El. Questa versione dell'interfaccia è stata oggetto di un'ampia divulgazione in congressi nazionali ed internazionali da parte di tutti i membri del gruppo:

- 40th ISCC (International Symposium on Capillary Chromatography) Riva del Garda 29/05/2016 – 03/06/2016.

- ASMS (American Society for Mass Spectrometry) annual conference 2016, San Antonio (USA, TX) 05/06/2016 – 09/06/2016.
- Incubatore Scientifico di Spettrometria di massa IMaSS, Torino 20/07/2016.
- XXVI Congresso della Divisione di Chimica Analitica, Giardini Naxos 18/09/2016 – 22/06/2016.
- MYCS (Merck Young Chemists Symposium), Rimini 25/10/2016 – 27/10/2016.

Uno schema riassuntivo di questa versione, con tutti gli upgrade, è riprodotto in Figura 55.

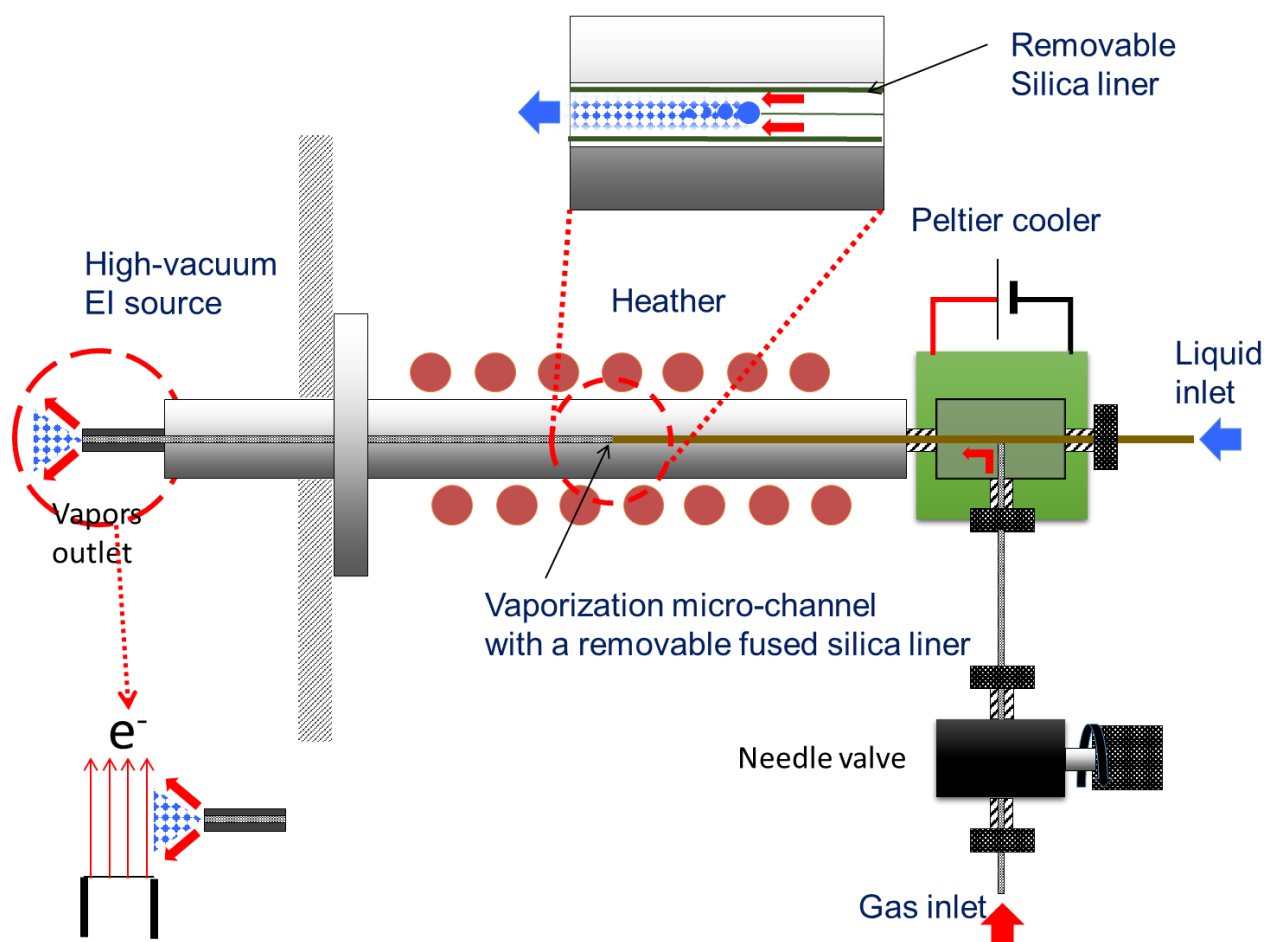


Figura 55. Secondo prototipo dell'interfaccia con il liner di vaporizzazione e la cella di Peltier.

Viste le premesse, l'interfaccia è stata installata anche su uno spettrometro di massa Agilent 7010 QqQ con sorgente di ionizzazione HEIS (*High Efficiency Ion Source*) per ottenere le massime prestazioni. In questo caso il cromatografo liquido è stato un Agilent 1290 Infinity U-HPLC a flusso convenzionale; la portata veniva resa compatibile con le esigenze del vuoto attraverso uno splitter passivo post-colonna da circa 1:200. Inoltre, la gestione del flusso di elio è stata migliorata

sostituendo la valvola a spillo a regolazione manuale con un dispositivo automatico dotato di flussimetro basato sul sistema che regola il carrier gas dei gascromatografi.

Grazie ai risultati straordinari ottenuti, l'interfaccia Liquid-El è stata la vincitrice del premio "*The Analytical Scientist Innovation Award*" (TASIA) 2016 bandito dalla testata di settore The Analytical Scientist. Il risultato è ancora di maggior pregio se si pensa che è stata una delle due invenzioni presentate da gruppi di ricerca universitari e non da grandi aziende del settore, avvantaggiate in termini di forze e risorse.

I risultati ottenuti con questo strumento sono stati oggetto di un articolo su *Analytical Chemistry* dal titolo: "Atmospheric Pressure Vaporization Mechanism for Coupling a Liquid Phase with Electron Ionization Mass Spectrometry".

In sintesi, l'articolo riporta l'invenzione dell'interfaccia Liquid-El e molti dettagli sulla sua messa a punto effettuata sullo strumento a triplo quadrupolo; la configurazione ottimale individuata è ovviamente molto simile a quella presentata nelle pagine precedenti per lo spettrometro Agilent 5975, dati gli stessi principi di funzionamento. La messa a punto è stata corredata da alcuni esperimenti che dimostrano le prestazioni dello strumento, tra cui:

- La separazione di una miscela standard di 20 POPs e 4 loro standard interni deuterati in MRM. Tra l'uscita della colonna e l'ingresso dell'interfaccia è stata interposto un detector UV-Vis così da poter apprezzare come profilo e ampiezza dei picchi sia la stessa; questo conferma che l'interfaccia non influenza il risultato della cromatografia.
- L'analisi in scan di un estratto di cervello di una vittima di SIDS. In questo caso, grazie alla deconvoluzione del segnale è stato possibile identificare il benzo(a)pyrene, presenza che è stata confermata dal riconoscimento dello spettro di massa con quello presente nella NIST. Il risultato è prezioso in quanto il benzo(a)pyrene, idrocarburo policiclico aromatico apolare, sarebbe stato impossibile da ionizzare ed identificare con sorgenti ambient.
- Valutazione dell'effetto matrice attraverso la comparazione di due curve di calibrazione del 4,5-dichloroisophthalodinitrile registrate con standard in solvente ed in estratto di terreno. Dai risultati sperimentali le due rette risultano comparabili, con differenze minime e trascurabili; è ragionevole affermare che con il Liquid-El l'effetto matrice è minimizzato.

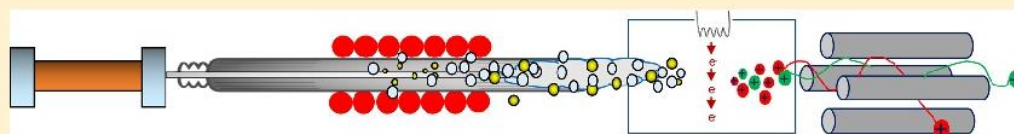
Per completezza il testo dell'articolo è riportato integralmente di seguito.

Atmospheric Pressure Vaporization Mechanism for Coupling a Liquid Phase with Electron Ionization Mass Spectrometry

Veronica Termopoli, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Maurizio Piergiovanni, and Achille Cappiello*

LC-MS Laboratory, Department of Pure and Applied Sciences, University of Urbino, Urbino, Italy

Supporting Information



ABSTRACT: A novel liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) interfacing concept is presented and discussed. The new interface, called liquid-EI (LEI), is based on electron ionization (EI) but, differently from any previous attempt, the vaporization of solutes and mobile phase takes place at atmospheric pressure into a specifically designed region, called “vaporization microchannel”, before entering the high-vacuum ion source. The interface is completely independent from the rest of the instrumentation and can be adapted to any gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) system, as an add-on for a rapid LC–MS conversion. Pressure drop and temperature gradient between LC and MS were considered to enhance the analyte response and reduce band broadening and/or solute carryovers. A fused silica liner, placed inside the vaporization microchannel, acts as an inert vaporization surface speeding up the gas-phase conversion of large molecules while lessening possible memory effects. The liner is easily replaceable for a quick and extremely simple interface maintenance. Proof of concept and detailed description of the interface are here presented.

The identification of unknown compounds is of increasing importance in food safety, environmental, forensic, and in many other investigation areas, where the presence of nontargeted compounds represents a key factor. Nowadays, the common trend in chemical analysis leans toward the identification of incipient threats and possible safety issues, at their early stages, through nontargeted monitoring technologies. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) has become the technique of choice and plays a leading role in routine analysis, whereas gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) is used only for the most volatile substances capable to withstand a gas-phase separation.¹

Because of the different type of chromatography, GC/MS relies on electron ionization (EI) whereas LC–MS primarily employs the electrospray ionization (ESI). These two techniques rely on a radically different ionization approach, and so are the mass spectral results. In fact, EI is a gas-phase, high-energy, physical form of ionization that generates odd electron ions ($M^{+\bullet}$); it is suitable for small, thermostable, volatile molecule applications. Because of the high-energy level involved in the ionization process, characteristic and highly reproducible fragmentation of the molecule is also achieved. Ion–molecule reactions are very unlikely; each ion is formed independently, therefore, signal suppression/enhancement phenomena are seldom observed. Electronic libraries of spectra are available for a fast and undoubted identification of the analytes. ESI is a liquid-phase ionization technique that generates even electron ions with low-energy transfer. ESI spectra typically show a single protonated or deprotonated molecular ion ($M + H$)⁺, ($M - H$)[−], and/or adduct ions. In-

source fragmentation can occur, however, most typically, it is generated via collision induced dissociation (CID) in a tandem MS (MS/MS). Nevertheless, the resulted mass spectra have never been collected in widely available electronic libraries. ESI response is tightly linked to the chemical composition of the sample and the mobile phase, so coeluted matrix components can interfere with the ionization process, promoting undesirable signal enhancement or suppression described as matrix effects (ME), especially when the complexity of the matrix is a troubling factor.^{2–8} Moreover, ESI response is strictly dependent on the polarity of the analytes, and it rapidly decreases as their hydrophobicity increases.⁹

In consideration of ESI's restraints, and because sample preparation for nontargeted analysis is often nonselective, mass-resolving power (R ; defined as full-width at half-maximum, fwhm) plays a key role in unveiling the molecular formula of the analytes. High-resolution mass spectrometry (HRMS) with high-mass accuracy and resolving power (HRAM) has emerged as a powerful tool for nontargeted analysis.^{10–27} However, HRAM based methods have limitations. False positives and false negatives are the major obstacles when screening complex samples. False negatives can occur due to very low concentrations, matrix interferences and suppression, and poor or no ionization. False positives can occur in complex mixtures with isobaric ions present. The United States Department of Agriculture (USDA) Food Safety and

Received: November 23, 2016

Accepted: January 19, 2017

Published: January 19, 2017

Table 1. List of the Selected Compounds, Classes, and MRM Acquisition Parameters

cmpd			MRM acquisition parameters			
	class	MW (g mol ⁻¹)	Q ^a	CE	q ^b	CE
tetrachloroisophthalodinitrile	organochlorine	265.9	266 → 231	15	266 → 168	20
4,5-dichloroisophthalodinitrile	organochlorine	197.0	196 → 125	20	196 → 161	10
2,5-dichloroisophthalodinitrile	organochlorine	197.0	196 → 125	20	196 → 161	10
acetamiprid	neonicotinoid	222.7	152 → 116	10	126 → 90	10
BPA	bisphenols	228.1	213 → 119	15	213 → 91	10
captan	phthalimide	300.6	149 → 105	5	264 → 106	5
thiram	ethylene bisdithiocarbamate	240.4	88 → 73	10	88 → 72	10
fludioxonil	phenylpyrrole	248.2	248 → 182	5	154 → 127	5
phosmet	organophosphate	317.0	160 → 133	10	160 → 77	5
fenhexamid	hydroxylanilide	302.2	177 → 113	10	97 → 69	10
boscalid	carboxamide	343.2	342 → 140	10	342 → 112	15
chlorfenvinphos	organophosphate	359.6	323 → 159	10	323 → 267	10
naphthalene	polycyclic aromatic hydrocarbon	128.2	128 → 77	30	128 → 102	30
imazalil	imidazole	297.2	173 → 145	10	173 → 109	10
lindane	organochlorine	290.8	181 → 145	10	219 → 183	10
zoxamide	benzamide	366.6	187 → 159	10	187 → 123	10
anthracene	polycyclic aromatic hydrocarbon	178.2	178 → 176	30	178 → 151	30
endosulphan II	organochlorine	406.9	207 → 172	10	241 → 106	5
pyriproxyfen	unclassified	321.3	136 → 96	20	136 → 96	10
4-octylphenol	phenol	206.2	107 → 77	10	107 → 79	10
chlorpyrifos	organophosphate	350.9	314 → 258	10	197 → 169	5
4-nonylphenol	phenol	220.2	107 → 77	10	107 → 79	10
benzo[k]fluoranthene	polycyclic aromatic hydrocarbon	252.3	252 → 250	30	252 → 250	30
benzo[a]pyrene	polycyclic aromatic hydrocarbon	252.3	252 → 250	30	252 → 250	30
indeno(1,2,3) cd-pyrene	polycyclic aromatic hydrocarbon	276.3				
caffeine	methylxantine	194.2	194 → 55	10	109 → 55	5
diethylstilbestrol	estrogens	268.3	268 → 145	15	268 → 139	10
bisphenol A D ₁₆	SIL	244.3	224 → 125	15		
chlorpyrifos methyl D ₆	SIL	328.2	292 → 99	20		
pyrene D ₁₀	SIL	212.2	212 → 184	35		
phosmet D ₆	SIL	323.3	160 → 133	15		

^aQuantitation transition. ^bConfirmatory transition.

Inspection Service (FSIS) requires to meet rate criteria for the acceptance of false positives and negatives in screening methods,^{20,26} values between ≤5% and ≤10%, respectively. Nowadays, most research of the suspect screening using HRMS are mainly focused on pesticides, mycotoxins, fungal metabolites, veterinary drugs, and plant toxins.^{10–12,14,18,19,21–27} Using mass measurements even at better than 2 ppm accuracy, complex samples can produce many false positives, and the number of possible elemental formulas within a given mass error increases exponentially with molecular weight. Filtering the list of potential molecular formulas is the first crucial step to obtain a correct elemental composition. To automatically restrict the hundreds of possible candidate structures, rules are applied to select the most likely and chemically correct molecular formula. Rules include restrictions for the number of elements; isotopic patterns, especially those from chlorine, bromine, and sulfur; hydrogen/carbon ratios; element ratio of nitrogen, oxygen, phosphorus, and sulfur versus carbon; element ratio probabilities; and a few others. From these considerations, it emerges that relying on HRAM alone is costly and cannot resolve all problems.

As previously stated, the advantage of EI for tentative identification of GC-amenable compounds is unparalleled without the need of HRAM data. Expansion of EI fragmentation to a wider variety of molecules in a liquid phase would provide an attractive alternative to identification

and would offer a complementary technique to HRAM, LC–MS instrumentation.

Several attempts have been made over the years to ionize analytes from a liquid effluent using EI. Since the year 2000, Amirav and his group^{28–30} developed LC–MS interfaces based on supersonic molecular beams (SMB). Recently, Rigano et al. presented a new nano-LC–EI–MS interface for the determination of free fatty acids in mussels.³¹

Our research group presented an LC–MS interface called Direct-EI^{32–35} based on the coupling of a low flow-rate nano-LC with a high-vacuum EI source. The nebulization and vaporization of the liquid stream occur inside the ion source. Because of the high-temperature, high-vacuum conditions inside the ion source, the analytes are brought to the gas-phase and ionized by an electron beam under a typical EI pathway. The background ions that come from the mobile phase residues do not alter the quality of the spectrum. This technique has been used in many different applications, not only in combination with chromatography but also in direct analysis,^{36–42} as a detector for targeted compounds.

However, as explained above, EI expresses its full potential in the identification of nontargeted analytes. In fact, in contrast to targeted analysis, nontargeted applications start without any preliminary information on the compounds to be detected, and standards are, obviously, not functional. The direct, unfiltered introduction of the liquid phase into the ion source of Direct-EI

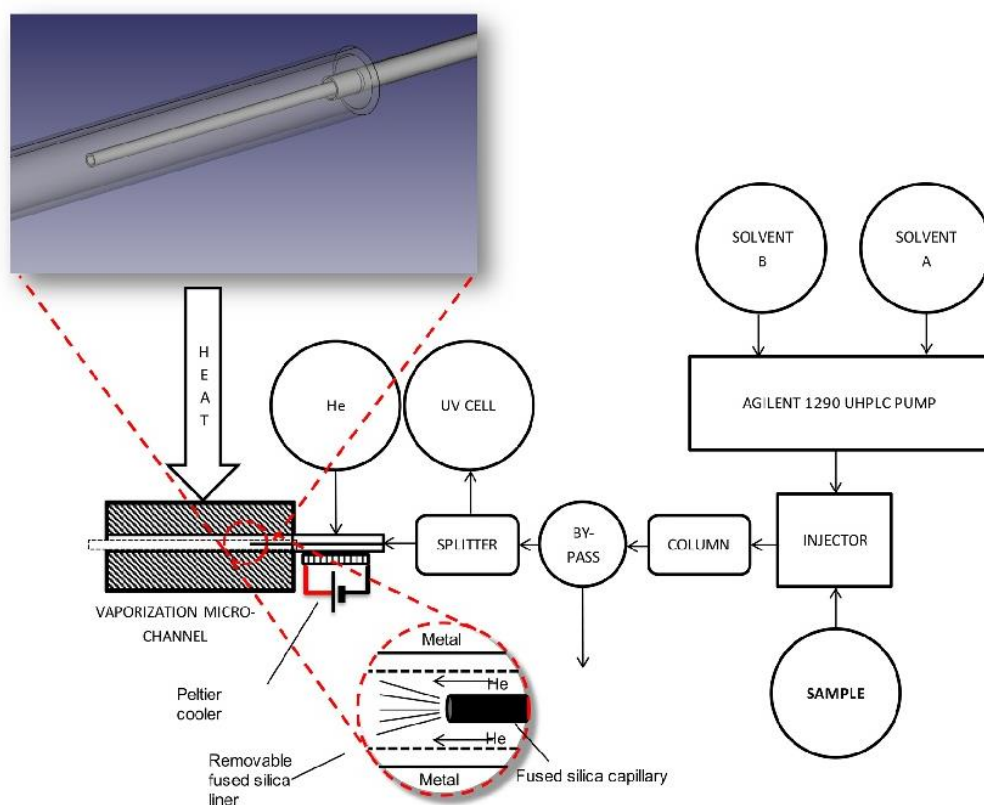


Figure 1. Global layout of the fully assembled system; the LEI interface, in gray, is between the UHPLC system and the MS detector. In the red circle the vaporization zone is highlighted.

does not provide an adequate setting to match the unpredictability of modern nontargeted analysis.

To meet the challenges of analyzing unexpected compounds at low concentrations in complex matrices under routine conditions, an in-source approach, especially designed for volatile substances, was not flexible enough. A new, robust, efficient interfacing mechanism has been developed from the ground up. The new interface design is called “liquid-EI”, LEI. In a LEI interface, the vaporization of the LC eluate is carried out at atmospheric pressure inside a suitable, independent microchannel right before entering the ion source. An inert gas flow carries the gas-phase molecules into the high-vacuum ion source. This solution anticipates the solute vaporization event immediately outside the ion source into a more suitable space in terms of dimensions, pressure, temperatures, and surface materials and is free of sensitive components and electric potentials. An independent and wide-ranging control of the vaporization conditions suits the need of a wide range of compounds that can be encountered in nontargeted applications. Preliminary results, carried out using a triple quadrupole system (QqQ), gave an optimistic impression, especially when the vaporization microchannel was covered with a ceramic layer.⁴³ Preliminary experiments were conducted using PAHs (2–6 rings) and other compounds of environmental interest, with and without column separation. Real world samples were also analyzed using LEI, with particular emphasis to address issues on identification of analytes at low levels, where mass spectral quality using HRAM can be an issue, and NMR may prove challenging, and further, complex

sample matrixes can give additional difficulties. This interface fills the gap left by those applications that ionize poorly with ESI, are affected by a significant ME, and that do not provide enough structural information for an undoubted identification.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. LC grade solvents were purchased from VWR International (Milan, Italy). Milli-Q water was produced using a Millipore Direct-Q 3 UV purification system (Millipore Corp., Milan, Italy). Fused silica capillaries of various diameters were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). Tetrachloroisophthalodinitrile, 4,5-dichloroisophthalodinitrile, 2,5-dichloroisophthalodinitrile, and the soil matrix were provided by Syngenta Ltd. The real sample of a SIDS victim was collected during an autopsy performed at the Hospital of Lecco (LC, Italy). The autopsy procedures were conducted in accordance with the International Standardized Autopsy Protocol of the Global Strategy Task Force of SIDS International.⁴⁴

Standard Solution Preparation. Tetrachloroisophthalodinitrile, 4,5-dichloroisophthalodinitrile, and 2,5-dichloroisophthalodinitrile (Table 1) stock solutions were prepared at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ in pure acetonitrile (ACN). Linear regression concentrations were prepared by dilution of stock solutions at the following concentrations: 1, 10, 50, 75, 100, 200 ng/mL . All solutions were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ in amber vials.

Twenty environmental priority pollutants (POPs), including four internal standards (BPA D_{16} , phosmet D_6 , chlorpyrifos-

methyl D₆, pyrene D₁₀) stock solution (Table 1) were prepared at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$, 70:30 (v/v) acetonitrile (ACN)/methanol.

Temperature Measurement. The thermocouple of choice was a type T, produced and purchased from Physitemp Instruments Inc. (Clifton, NJ). The thermocamera was a Flir E40 infrared camera (FLIR System, Estonia) employed in wide range mode (0–650 °C).

LEI-MS Conditions. Liquid Chromatography. The analyses were performed with an Agilent 1290 Infinity UHPLC system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). The 24 compounds mixture was analyzed with a Sun-Shell C18 column 2.6 μm particle size (1 mm \times 150 mm) (Chromanick Technologies Inc., Japan), using the following gradient elution: 1 min isocratic 0% ACN, from 0% to 40% ACN in 30 s, then up to 100% ACN in 20 min. The flow rate was 100 $\mu\text{L/min}$, the split ratio was 1:200, and the injection volume was 10 μL . The mixture of tetrachloroisophthalodinitrile, 4,5-dichloroisophthalodinitrile, and 2,5-dichloroisophthalodinitrile was analyzed with an Agilent Eclipse C18 column (2.1 mm \times 50 mm) with 1.7 μm particle size. A guard column (Agilent UHPLC guard, Zorbax SB-C18, 2.1 mm \times 5 mm, 1.8 μm particle size) was installed to prevent analytical column damages. Gradient: 1 min isocratic 0% ACN, from 0% to 50% ACN in 30 s, then up to 70% ACN in 3.5 min. The injection volume was 100 μL .

Mass Spectrometry. The mass spectrometer was an Agilent 7010 QQQ triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) equipped with a high efficiency ion source (HEIS) that allowed a better ionization efficiency. Instrument tuning was performed daily at an ion source temperature of 280 °C, using perfluorotributylamine as a reference compound, monitoring its characteristic ions. No mobile phase was admitted into the ion source during this procedure. The ion source was operated at 280 °C during the LEI analyses and the vaporization microchannel temperature was 350 °C. The Peltier unit was on. Data acquisition was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) as reported in Table 1. Full scan analyses were conducted in a range of m/z 80–200 for caffeine and m/z 80–300 for diethylstilbestrol with 1000 data samples, 1 cyc/s, and threshold 10.

RESULTS AND DISCUSSION

Overview. Figure 1 shows a complete layout of the LC–MS system used in this work equipped with the LEI interface. LEI works at flow rates up to 1500 nL/min , with an ideal range between 300 and 800 nL/min . A liquid flow of 1000 nL/min roughly corresponds to 1 mL/min of gas flow which is compatible with a typical EI source. The optimal flow rate derives from the compromise among different parameters that influence the ionization efficiency once all the liquid flow is converted into the gas-phase and moved into the ion source: (1) peak width, (2) MS pumping rate, (3) ion source design and vacuum under LC steady or variable conditions, (4) compound and mobile phase chemical properties, (5) space-charge effects.

The LEI interface is designed around a nano-HPLC separation that perfectly fits into the optimal working liquid flow range. However, in our case, the HPLC chromatograph was a conventional UHPLC binary system compatible with 1–4.6 mm i.d. columns and, therefore, with operative flow rates in the order of hundreds of $\mu\text{L/min}$, much higher of the LEI tolerable flow rate. This choice allows for a wider selection of columns and permits more robust chromatographic separa-

tions. The drop-in flow rate, necessary to feed the interface, is obtained after-column with a two-way splitter. The split flow rate, not used for the MS detection, was addressed to an UV cell before being discarded, allowing an additional, simultaneous detection profile. Considering an MS flow rate of 500 nL/min , different split ratios, ranging between 100 and 200, were used.

As previously pointed out, LEI is a standalone piece of equipment that converts a GC/MS into an LC–MS without modifications on either side of the systems. In principle, any GC/MS can be effortlessly coupled with a compatible LC pump. The easy reversion back to GC/MS can be done at any time.

Description of the Interface. The core of LEI is the vaporization microchannel, a 170 mm long, 0.9 mm wide SS tubing for the vaporization and transport of the LC eluate into the ion source. It is attached to the MS body and connected to the GC inlet port of the EI source on one end, and to the LC splitter on the other. The microchannel, that can be heated up to 400 °C, was built modifying a standard GC transfer line, entirely lined with a 0.4 mm i.d., 0.8 mm o.d. removable fused silica capillary (liner). This liner prevents any contact of the analytes with the metal surface, reducing the chances of thermal decomposition and/or delayed vaporization, especially for the largest and less volatile substances of the sample. A narrower 150 μm o.d., 25 μm i.d. fused silica capillary (inlet) penetrates in the first portion of the liner and releases the LC eluate. The small internal diameter of the vaporization microchannel de facto separates the high-vacuum zone of the ion source from the atmospheric pressure found at the end of the LC capillary where the eluate immediately vaporizes upon contact with the hot zone of the microchannel. The formed gas-phase moves toward the ion source following the pressure gradient. The size difference between the inlet capillary and the liner creates a 125 μm of a ring-shape space that allows the passage of a helium flow. The gas flow surrounds the inner capillary and speeds up the transport of the vapors into the ion source. In addition, the pressure drop between the LC and the MS avoids any vapor backflow. The microchannel has a total internal volume of 19 μL . For a helium flow of 200 $\mu\text{L/min}$, the residence time of the analytes into the hot zone of the interface before ionization is minimized to approximately 6 s, with a linear speed of 2.5 cm/s . A short residence time of the analytes in the hot region lessens the occurrence of thermal degradation phenomena and extends the range of possible applications. Another key component of the interface is the Peltier unit, which is placed at the entrance of the vaporization microchannel, in contact with a tee union where the helium gas meets the incoming liquid capillary. This cooling device subtracts part of the heat that diffuses backward from the hot region of the interface.

Figure 2 shows the effect of the Peltier unit on the liquid temperature before entering the vaporization microchannel. With the Peltier switched off the mobile phase reaches a temperature of approximately 55 °C with a microchannel temperature set at 350 °C before even entering the microchannel. This temperature was measured with a thermocouple in contact with the tee union. Details of the Peltier unit temperature variations and stability are shown in the Supporting Information, Figures S-1 and S-2. This value is high enough to promote an early evaporation of most mobile phase solvents with a consequent solute precipitation and capillary clogging. After powering the Peltier unit, the liquid temperature drops to 40 °C, 15 °C below the boiling point of

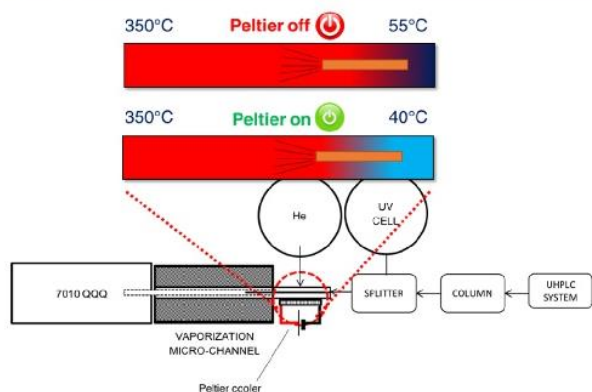


Figure 2. External temperature distribution between the vaporization microchannel set at 350 °C and the tee union with the Peltier cell ON and OFF. The cooling effect targets only the tee union, but its presence helps to reduce the heat exchanged with the liquid eluate.

methanol, the most volatile of the typical reverse-phase solvents (see Supporting Information, Table S-1).

Totally nonvolatile substances cannot be analyzed with this interface, causing precipitation and clogging of the interface itself. In the case of nonvolatile substances eluted by the column at a given retention time range, to protect the interface vaporization microchannel from clogging, a bypass valve is placed before the splitter with the purpose to temporarily divert

the incoming eluate to the waste. The valve can be opened again when the MS acquisition is needed.

Proof of Concept. The preliminary investigation of the LEI interface gave a clear idea of its potential. A detailed description of the results obtained are reported in Supporting Information, Figures S-3–S-6.

A mixture of 20 POPs, including four internal standards (BPA D₁₆, phosmet D₆, chlorpyrifos-methyl D₆, pyrene D₁₀) were analyzed in full scan and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The UV trace was also collected at the exit of the column and before LEI.

The MRM and UV profiles are reported in Figure 3. The compounds selected belong to different classes and widely span in terms of polarity, as shown in Table 1. Because of these key differences, none of the current, commercially available LC–MS systems would be able to analyze all the components of this mixture at once. Especially, the less polar species would require a separate GC/MS analysis, with additional costs, complexity and time. As shown in Figure 3, all compounds gave a very good response both in terms of signal-to-noise (S/N) ratio and peak shape (100 ng/mL injected). A close comparison between the MRM and the UV trace shows a perfect match in terms of chromatographic resolution and peak width, demonstrating an unnoticeable interference of the interface mechanism in the conversion and transport of the solutes from the column to the ion source. Differences in terms of response only depend on the presence of chromophores. In full scan mode, the average mass spectra of each component were extracted from the mass

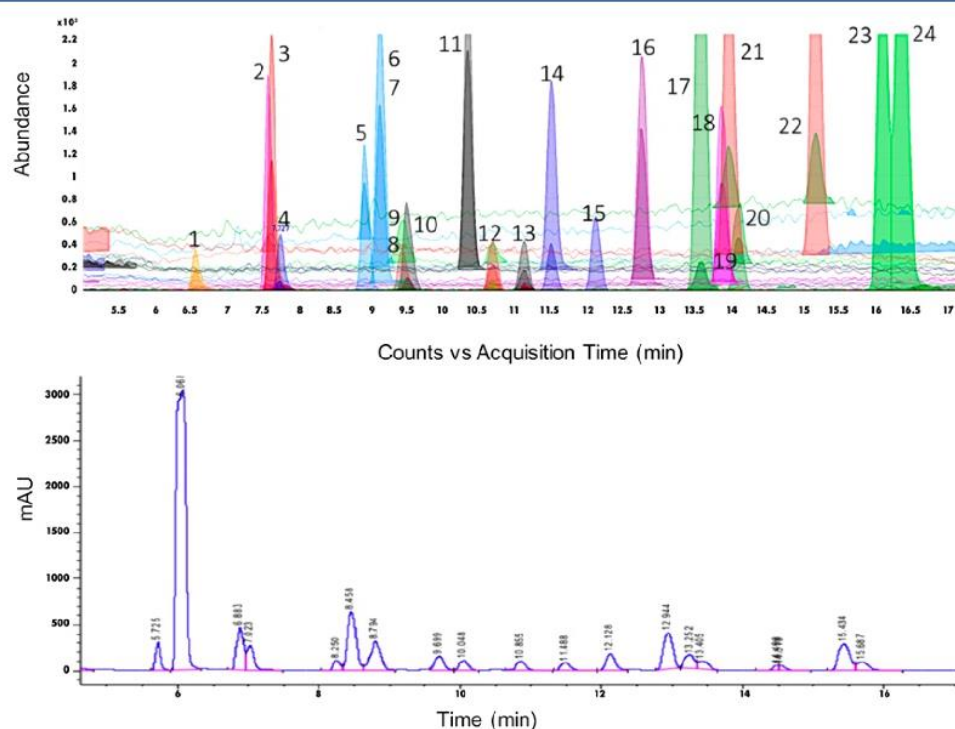


Figure 3. Separation of 20 POPs and 4 internal standards of different physicochemical properties: (1) acetamiprid, (2) BPA D₁₆, (3) BPA, (4) thiram, (5) fludioxonil, (6) phosmet D₆, (7) phosmet, (8) fenhexamid, (9) imazalil, (10) boscalid, (11) naphthalene, (12) chlorfenvinfos, (13) lindane, (14) zoxamide, (15) chlorpyrifos-methyl D₆, (16) anthracene, (17) pyrene D₁₀, (18) pyriproxyfen, (19) 4-*n*-octyl phenol, (20) endosulfan II, (21) chlorpyrifos, (22) 4-*n*-nonyl phenol, (23) benzo[*k*]fluoranthene, (24) benzo[*a*]pyrene. The MRM chromatogram was registered immediately (0.5 min delay) after UV detection (230 nm). The two profiles show an optimal correspondence in terms of peak width and chromatographic resolution, indicating a negligible impact of the interfacing process.

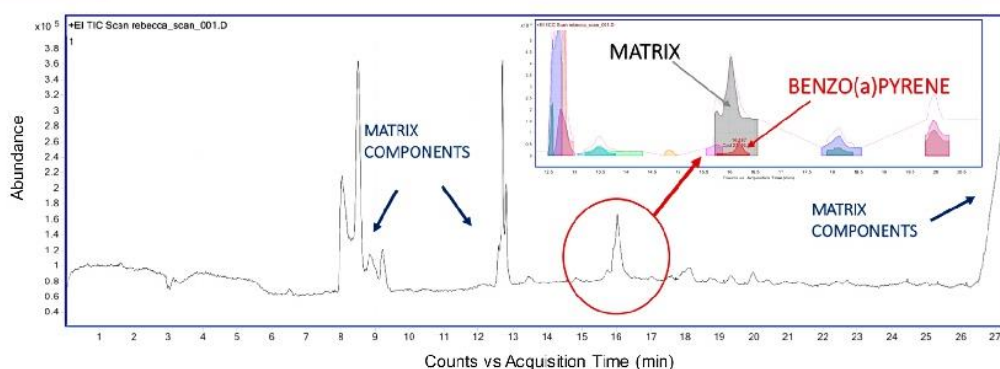


Figure 4. Analysis of an extract obtained from a SIDS victim's brain sample; the signal has been acquired in full scan mode to detect possible unknowns. In the chromatogram, thanks to a deconvolution program, it was possible to identify benzo[*a*]pyrene beneath the large matrix peak at acquisition time 16 min. An excellent NIST matching confirmed the presence of this compound.

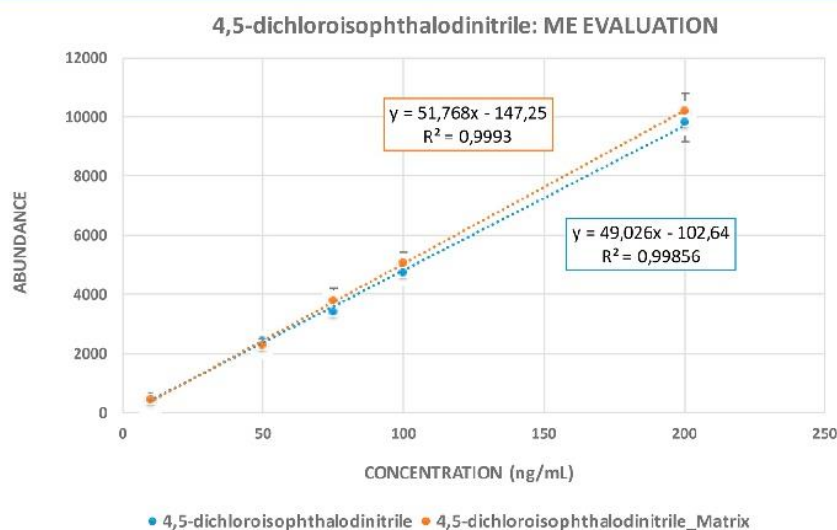


Figure 5. Calibration curves of 4,5-dichloroisophthalodinitrile in pure solvent and extracted from a soil matrix; R^2 values are good for both plots and the almost identical slope demonstrates the absence of matrix effects. Linear regression concentrations: 1, 10, 50, 75, 100, 200 ng/mL.

chromatogram and matched with a NIST 2.0 (2011) electronic mass spectral library for an evaluation of the quality of the spectra generated, reporting the following data: matching factor 671–946, reverse matching factor 724–967, probability 60.3–93.9. The results demonstrate the intact ability of the mass spectrometer, equipped with a LEI interface, to generate top-quality EI mass spectra even from a liquid-phase. Limits of detection (LODs) vary widely depending on the compound and on the complexity of the sample. Generally, MRM detection requires a low-ppb concentration or higher, whereas low-ppm is the minimum requirement for a clear, interpretable mass spectrum.

Robustness was evaluated measuring the response of the interface in different operative conditions. Caffeine and diethylstilbestrol were used as test compounds. The two substances were injected at different mobile phase compositions, using water/acetonitrile in one case and water/methanol in another one, changing each combination from 10:90 (v/v) to 90:10 (v/v), as shown in Supporting Information, Figures S-3 and Figure S-4. The signal was acquired in MRM and in full scan, simulating real analysis conditions. Thus, the signal intensity of the two compounds was only slightly affected by

the mobile phase composition, perhaps due to the different solubility and surface tension caused by the variation of the composition of the mobile phase. Methanol, a better proton donor than acetonitrile, generated more chemical ionization ions ($M + H$)⁺, especially in caffeine experiments, without an appreciable decrement of the mass spectral quality. Chemical ionization (CI) may interfere with the expected abundance of the isotopic ions enhancing the $M + 1$ signal. For more details, please refer to the Supporting Information, Figure S-5. The occurrence of CI was also investigated at different flow rates of the mobile phase (water/acetonitrile), in order to evaluate the influence of the organic modifier. As demonstrated in the Supporting Information Figure S-6, ($M + H$)⁺ formation was minimal for diethylstilbestrol, and mass spectral quality was optimal at the lowest flow rate.

One of the key highlights of LEI is its ability to identify nontargeted compounds. This characteristic is amplified when using modern deconvolution programs that help to eliminate the background noise, and to separate every single mass spectrum recorded during a specific sample elution. A little portion of a brain sample obtained from a sudden infant death syndrome (SIDS) victim was extracted and analyzed with LEI

in full scan mode to search for possible environmental toxic contaminants.⁴⁵

Figure 4 summarizes the results. The mass chromatogram reports several peaks originating from the residues of the brain matrix after the extraction procedure. However, after running the deconvolution software (Agilent Mass Hunter Unknown Analysis), a small signal appeared underneath a large matrix peak. This signal was unquestionably identified as benzo[*a*]-pyrene. This finding was confirmed by the MRM analysis as shown in the Supporting Information, Figure S-7. This result represents a distinctive, straightforward identification approach from a liquid-phase obtained with a LEI interface, difficult or impossible to replicate using conventional instrumentation.

Another important aspect that strongly characterizes LEI is its tolerance to the interfering coeluted compounds coming from the matrix (ME). Differently from ESI, where matrix components compete at a different extent for the available ionization charges, the gas-phase ionization typical of LEI minimizes intermolecule reactions and, therefore, ion suppression or enhancement are rarely observed.

Figure 5 shows two calibration curves obtained for 4,5-dichloroisophthalodinitrile, a common pesticide, with and without the matrix. In this case, matrix samples were prepared from a postextraction addition of a soil matrix. In presence of ME, the resulting slope is different from the reference one, and the two slopes diverge wisely. In the figure, the two linear regression plots are almost overlapping, indicating a negligible ME.

CONCLUSIONS

The data presented in this study demonstrate the effectiveness of LEI as a novel LC–MS interfacing approach. The vaporization step is critical for the effective use of this type of mechanism, where the gas-phase conversion is complex, especially when measuring high-boiling compounds, such as those that can be eluted from an LC column. The rapid vaporization offered by the lined microchannel reduces the chance of thermal decomposition and broadens the range of suitable applications, especially those regarding nontargeted analytes. Remarkable results were obtained in different experimental setups. Fused silica based, replaceable liners offer great performance and easy maintenance. Even though this is a preliminary study, focused on a limited number of analytes, it unveils novel strategies in the use of EI in LC–MS analysis, offering a valuable tool for the characterization of complex samples.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04646.

Peltier unit performance, response vs organic solvent composition experiments, chemical ionization experiments, and nontargeted analysis (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: achille.cappiello@uniurb.it.

ORCID

Achille Cappiello: 0000-0002-6416-304X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Agilent Technologies for the financial support and for providing the analytical instrumentation. The authors would also like to thank Mansoor Saeed (Syngenta Ltd.) and Simon Perry (Syngenta Ltd.) in providing some of the analytes. Special thanks are due to ILVA Glass SpA for providing the thermocamera apparatus.

REFERENCES

- (1) Milman, B. L. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, 69, 24–33.
- (2) Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, 30, 491–509.
- (3) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Trufelli, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, 33, 1067–1081.
- (4) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Pierini, E.; Termopoli, V.; Trufelli, H. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9343–9348.
- (5) Matuszewski, B. K. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, 830, 293–300.
- (6) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 882–889.
- (7) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3019–3030.
- (8) Mei, H.; Hsieh, Y.; Nardo, C.; Xu, X.; Wang, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 97–103.
- (9) Oss, M.; Krueve, A.; Herodes, K.; Leito, I. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2865–2872.
- (10) Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Veprikova, Z.; Godula, M.; Hajslova, J. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 863, 29–40.
- (11) Gomez-Perez, M. L.; Plaza-Bolanos, P.; Romero-Gonzalez, R.; Martinez-Vidal, J. L.; Garrido-Frenich, A. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1248, 130–138.
- (12) Gomez-Ramos, M. M.; Ferrer, C.; Malato, O.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A. R. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1287, 24–37.
- (13) Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Ibanez, M.; Abad, E.; Portoles, T.; Mattioli, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 1251–1264.
- (14) Jia, W.; Chu, X. G.; Ling, Y.; Huang, J. R.; Chang, J. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1347, 122–128.
- (15) Kaufmann, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 1233–1249.
- (16) Kellmann, M.; Muenster, H.; Zomer, P.; Mol, H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 1464–1476.
- (17) Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 943–951.
- (18) Lehner, S. M.; Neumann, N. K. N.; Sulyok, M.; Lemmens, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. *Food Addit. Contam., Part A* **2011**, 28, 1457–1468.
- (19) Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Geis-Asteggiane, L.; Schneider, M. J.; Dutko, T.; Ng, C.; Bluhm, L.; Mastovska, K. *Drug Test. Anal.* **2012**, 4, 75–90.
- (20) Lehotay, S. J.; Sapozhnikova, Y.; Mol, H. G. *J. TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, 69, 62–75.
- (21) Mezcua, M.; Malato, O.; Garcia-Reyes, J. F.; Molina-Diaz, A.; Fernandez-Alba, A. R. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 913–929.
- (22) Mol, H. G. J.; Van Dam, R. C. J.; Zomer, P.; Mulder, P. P. J. *Food Addit. Contam., Part A* **2011**, 28, 1405–1423.
- (23) Mol, H. G. J.; Zomer, P.; de Koning, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 2891–2908.
- (24) Nielsen, M. W. F.; van Engelen, M. C.; Zuiderent, R.; Ramaker, R. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 586, 122–129.
- (25) Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423–4435.
- (26) van der Heeft, E.; Bolck, Y. J. C.; Beumer, B.; Nijrolder, A.; Stolker, A. A. M.; Nielsen, M. W. F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 451–463.
- (27) Wang, J.; Chow, W.; Leung, D.; Chang, J. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 12088–12104.

- (28) Amirav, A.; Granot, O. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 587–591.
- (29) Granot, O.; Amirav, A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *244*, 15–28.
- (30) Seemann, B.; Alon, T.; Tsizin, S.; Fialkov, A. B.; Amirav, A. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50*, 1252–1263.
- (31) Rigano, F.; Albergamo, A.; Sciarrone, D.; Beccaria, M.; Purcaro, G.; Mondello, L. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4021–4028.
- (32) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Pierini, E.; Palma, P.; Trufelli, H. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5364–5372.
- (33) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Pierini, E.; Termopoli, V.; Trufelli, H. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 1242–1255.
- (34) Palma, P.; Famiglini, G.; Trufelli, H.; Pierini, E.; Termopoli, V.; Cappiello, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2683–2693.
- (35) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Termopoli, V.; Capriotti, F.; Cellar, N. *Sep. Sci.* **2013**, *5*, 13–17.
- (36) Famiglini, G.; Termopoli, V.; Palma, P.; Cappiello, A. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1048–1054.
- (37) Termopoli, V.; Famiglini, G.; Palma, P.; Cappiello, A.; Vandergrift, G. W.; Krogh, E. T.; Gill, C. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 301–308.
- (38) Famiglini, G.; Termopoli, V.; Palma, P.; Capriotti, F.; Cappiello, A. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 1339–1345.
- (39) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Termopoli, V.; Trufelli, H. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1255*, 286–290.
- (40) Cappiello, A.; Tirillini, B.; Famiglini, G.; Trufelli, H.; Termopoli, V.; Flender, C. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 191–196.
- (41) Cappiello, A.; Famiglini, G.; Termopoli, V.; Trufelli, H.; Zazzeroni, R.; Jacquilleot, S.; Radici, L.; Saib, O. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8537–8542.
- (42) Trufelli, H.; Famiglini, G.; Termopoli, V.; Cappiello, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2933–2941.
- (43) Magrini, L.; Famiglini, G.; Palma, P.; Termopoli, V.; Cappiello, A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 153–160.
- (44) Krous, H. F. *J. Sudden Infant Death Syndrome Infant Mortal* **1996**, *1*, 203–246.
- (45) Termopoli, V.; Famiglini, G.; Palma, P.; Magrini, L.; Cappiello, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2463–2472.

TERZO PROTOTIPO

Il secondo prototipo dell'interfaccia è stato un importante passo avanti nel miglioramento delle prestazioni e dell'affidabilità. Ciononostante, mentre l'impiego del liner e la conversione della camera di vaporizzazione in vaporization micro-channel si sono dimostrati risolutivi per la problematica proposta, il raffreddamento con la cella di Peltier era riuscito a migliorare la situazione solo in maniera marginale. I fenomeni di occlusione del capillare di vaporizzazione si erano sensibilmente ridotti, dimostrando che l'evaporazione precoce della fase mobile era la vera problematica. La riduzione della temperatura sul punto sommatore di 15°C non era sufficiente per far sì che la vaporizzazione avvenisse solo all'uscita del capillare e non prima; va inoltre sottolineato che questo raffreddamento è stato misurato sul retro della parte a diretto contatto della cella e non sull'esterno delle filettature del punto sommatore. A poco è servito l'aggiunta di un secondo sistema di raffreddamento posizionato sul lato opposto.

La sola parte riscaldata dell'interfaccia è la vaporization micro-channel grazie all'uso del manicotto al suo esterno; il punto sommatore aumenta la propria temperatura unicamente attraverso la conduzione dovuta al contatto con la filettatura. Il miglior modo per evitare tutto questo è quello di evitare il contatto tra le due parti, ovvero di interporre un componente che faccia da isolante.

La soluzione è stata l'impiego di un nuovo componente definito "cooling gap"; questo è semplicemente un prolungamento del liner di circa 5-6 cm che fuoriesce rispetto all'imbocco della camera di vaporizzazione. In questa configurazione il punto sommatore si trova a condizioni di temperatura e pressione ambientali, valori per cui la fase mobile è stabilmente liquida. Le connessioni usate sono di tipo gascromatografico sulla camera di vaporizzazione, e per cromatografia liquida nel lato freddo. Spostando questo componente di circa 5-6 cm rispetto alla posizione studiata nelle prime due versioni, anche il capillare di vaporizzazione dovrà essere riposizionato di conseguenza; il parametro fondamentale in merito è la sua posizione rispetto al manicotto riscaldante e all'uscita in sorgente. Con quest'ultima configurazione la posizione del capillare ottimale è un parametro meno critico in quanto le prestazioni ne risentono molto meno. Una rappresentazione degli upgrade apportati nel terzo prototipo è riportata in Figura 56.

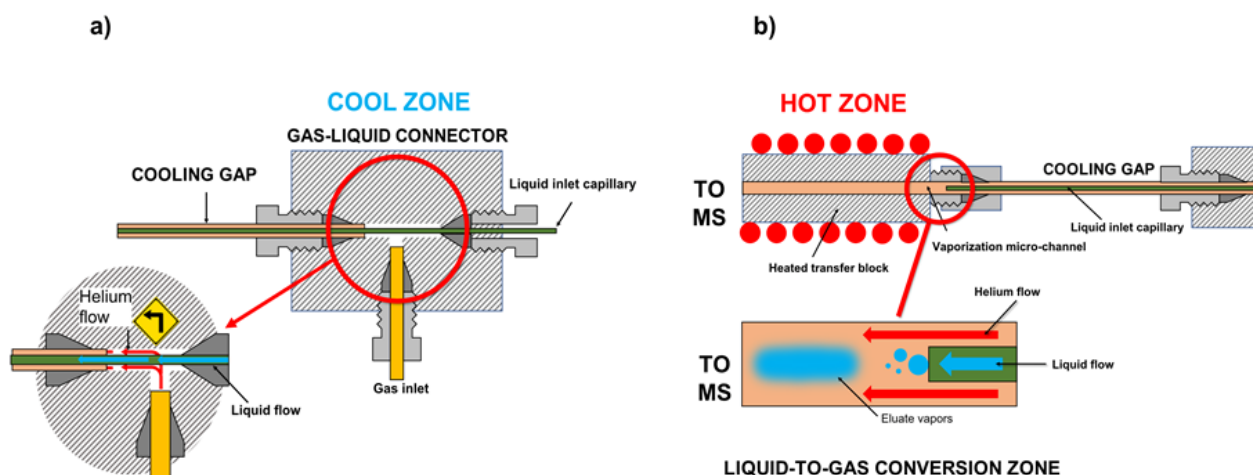


Figura 56. Schema della configurazione dei nuovi componenti del terzo prototipo del Liquid-El. a) Sezione del punto sommatore con dettaglio delle connessioni per HPLC e del posizionamento di liner e capillari. b) Cooling gap e vaporization micro-channel con rappresentazione del processo di vaporizzazione.

Con il terzo prototipo l'interfaccia Liquid-El ha mostrato il massimo rapporto tra prestazioni ed affidabilità; è ragionevole affermare che in questa configurazione la tecnologia proposta ha raggiunto la propria maturità. I fermi macchina dovuti all'occlusione del capillare sono diventati sporadici e solo con l'iniezione di campioni concentrati e/o matrici complesse.

Un altro importante miglioramento è stato portato dall'uso della tecnologia Agilent Nanodapter; in sintesi questo dispositivo è uno splitter passivo pre-colonna in grado di convertire il flusso di liquido del cromatografo Agilent Infinity II 1290 UHPLC a valori compresi tra 100 e 1000 nL/min, e di permetterne l'accoppiamento con spettrometri con sorgenti nanoelettrospray (137). Grazie al Nanodapter è possibile separare le molecole del campione con colonne di diametro interno compreso tra 75 μm e 150 μm , tipici della nano HPLC, mantenendo pressioni in gradiente fino a 1000 bar. Nel corso degli esperimenti il Nanodapter ha mostrato problemi legati alla non linearità di splittaggio in funzione della composizione della fase mobile; nel corso del gradiente, la viscosità del liquido non è costante e con essa la contropressione in testa alla colonna. A causa di questa non linearità anche il flusso erogato risulta non essere costante e questo determina una diversa velocità della fase mobile e quindi differenti condizioni cromatografiche ed all'interno dell'interfaccia. Per contrastare questo comportamento sono stati usati gradienti di composizione e di portata in contemporanea tali da mantenere il flusso reale costante. Impiegando direttamente cromatografi nano-HPLC il Nanodapter non è necessario.

Uno schema del terzo ed ultimo prototipo dell'interfaccia Liquid-El allestito in un sistema LC-MS completo è riportato in Figura 57.

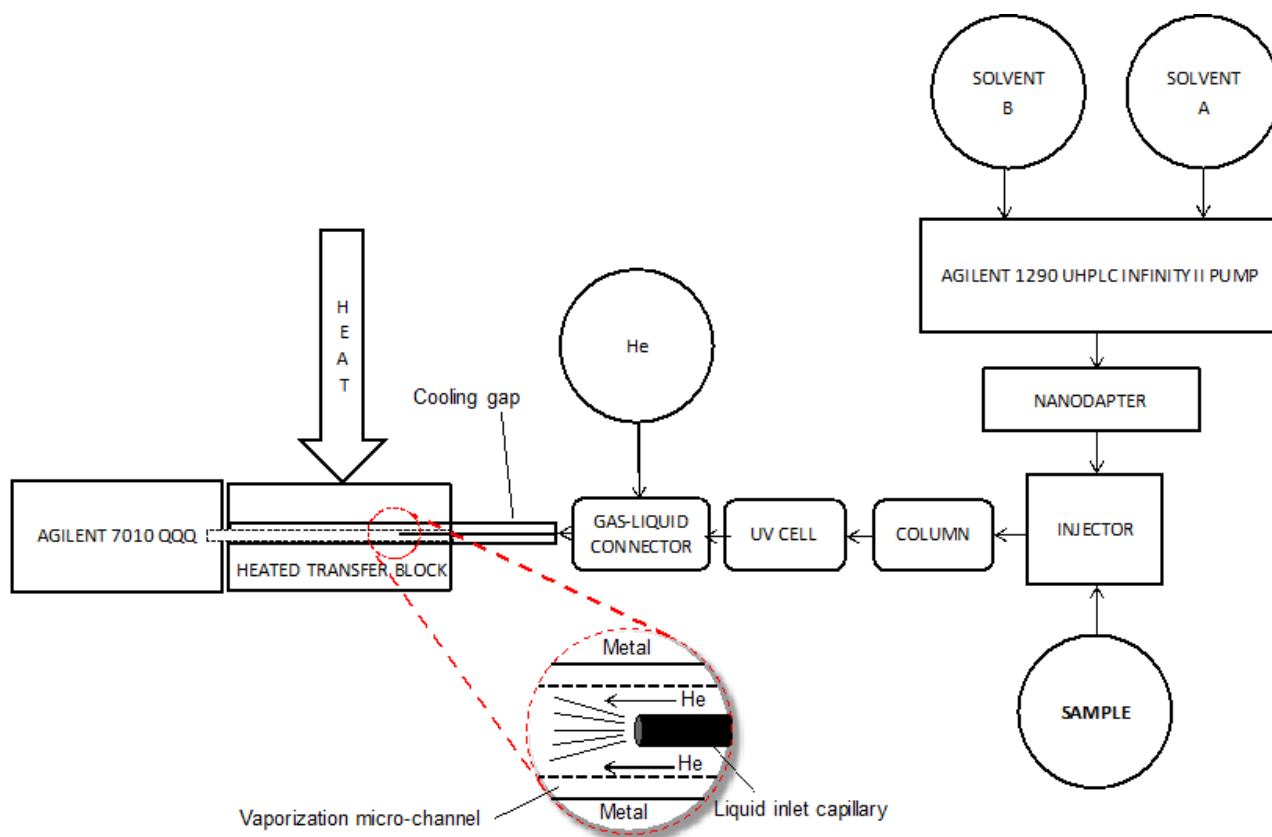


Figura 57. Schema a blocchi di un sistema LC-MS dotato del terzo prototipo del Liquid-El e del Nanodapter.

La configurazione del Liquid-El dotata di cooling-gap è stata oggetto di domanda di brevetto internazionale con il nome: “Macchina per analisi chimica comprendente la combinazione della spettrometria di massa a ionizzazione elettronica con la cromatografia liquida”. La domanda è attualmente oggetto di esame da parte della commissione.

Con questa versione dell'interfaccia sono stati condotti esperimenti estremamente innovativi in grado di dare risultati di elevatissimo livello. Le prestazioni dello strumento con approccio *untargeted* sono state valutate con analisi in scan di soluzioni standard di molecole inadatte o impossibili da trattare in gascromatografia.

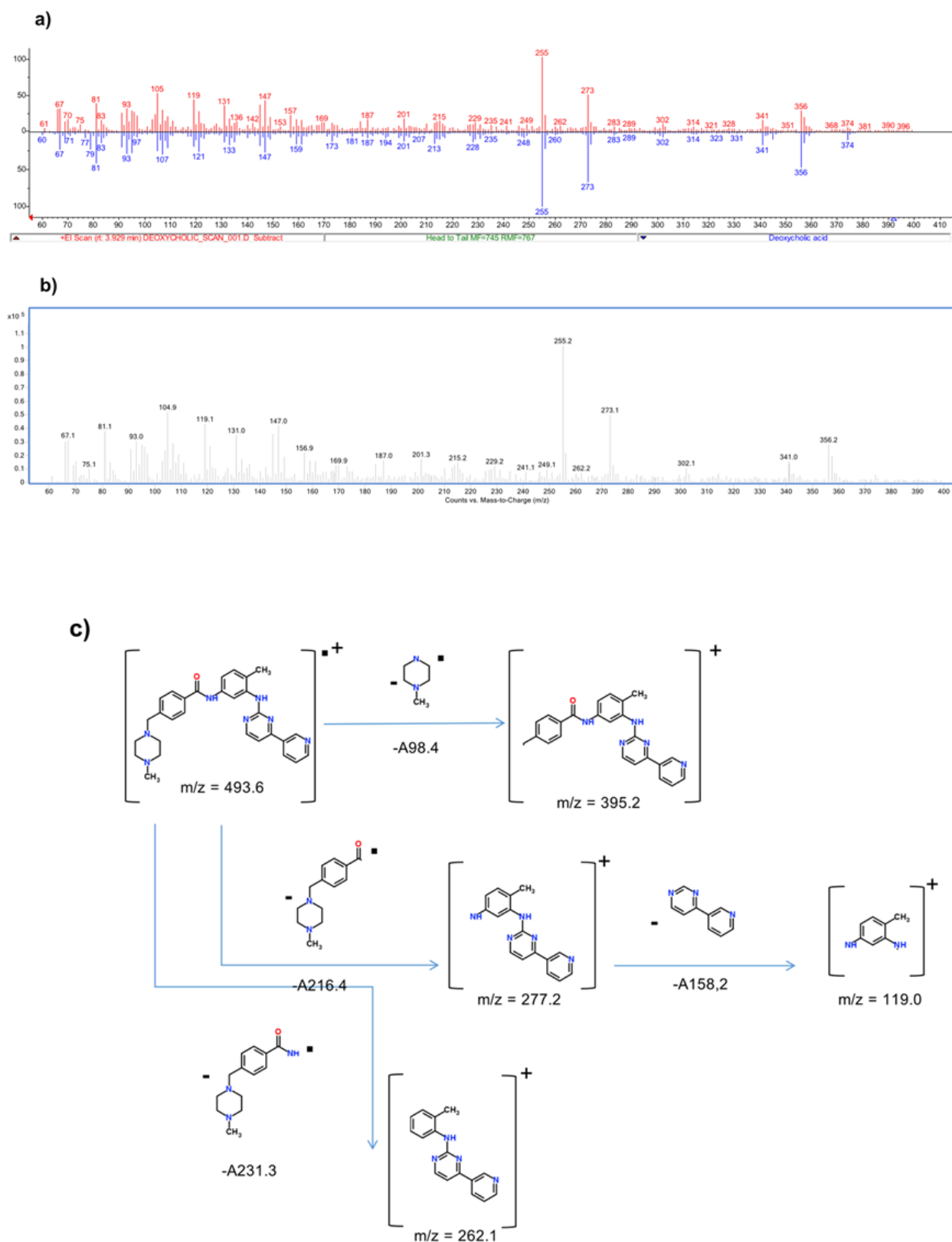


Figura 58. Spettri EI dell'acido deossicolico (a) e dell'Imatinib (b). Solo per l'acido deossicolico è presente un riscontro nella libreria NIST; l'Imatinib invece è stato analizzato in EI per la prima volta in questa occasione.

Gli spettri di una soluzione di una soluzione in di acido deossicolico 500 µg/mL in CH₃CN (Figura 58-a) e di Imatinib 500 µg/mL in CH₃CN (Figura 59-b) sono stati acquisiti con le seguenti condizioni strumentali:

Strumento HPLC: Agilent Infinity II 1290 + Nanodapter, fase mobile a composizione fissa (H₂O 97%:CH₃CN 3%):CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL).

Configurazione FIA.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 350°C.

Diametro del capillare: 50 µm, posizione impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 7010 con sorgente HEIS, sorgente EI a 280°C, acquisizione scan (m/z: 80 → 600, threshold: 10, scan time: 700 ms, data sample: 12).

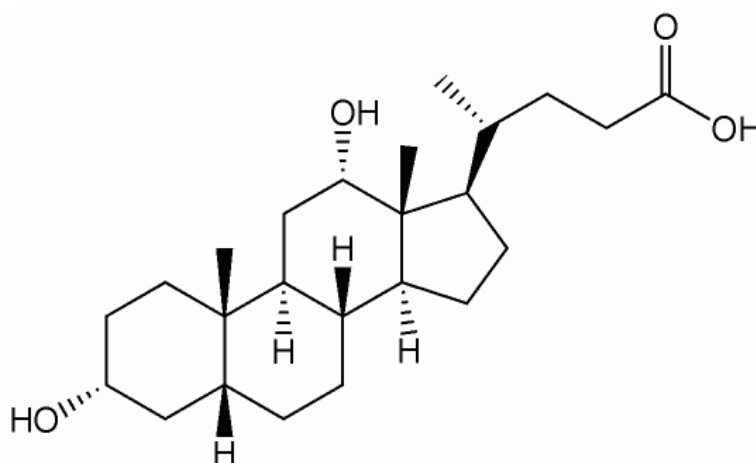


Figura 59. Formula di struttura scheletrica dell'acido deossicolico.

L'acido deossicolico (Figura 59) è un acido biliare prodotto nel fegato come prodotto di ossidazione del colesterolo; complice il suo elevato peso molecolare (MM: 392,57 u) e la presenza di 3 funzioni OH in grado di dare e ricevere legame a idrogeno, la temperatura di ebollizione di questa molecola è superiore alla temperatura di degradazione (138). L'analisi degli acidi biliari è convenzionalmente condotta in LC-MS con sorgenti ambient ma con cui non è possibile discriminare tra isomeri posizionali se non con l'ausilio del tempo di ritenzione o dell'uso di tecnologie particolari come "Ion mobility". Molecole con funzionalità di tipo acido carbossilico sono trattate in GC attraverso la derivatizzazione degli OH in trialchilsilileteri; questo aggiunge

complicazioni al processo analitico oltre a rendere lo spettro di massa non più fedele a quello del composto investigato. Con l'interfaccia Liquid-El è stato possibile acquisire lo spettro della suddetta molecola senza nessun accorgimento particolare; eccezionale la corrispondenza tra lo spettro NIST registrato con la vaporizzazione effettuata in sorgente da sostanza pura. La corrispondenza tra ioni ed anche il rapporto tra le loro abbondanze relative sono perfettamente speculari tra spettro sperimentale e standard.

Discorso simile può esser fatto per l'Imatinib. Questa molecola è ampiamente conosciuta per il suo uso in ambito chemioterapico per la cura della leucemia mieloide cronica (LMC) e della leucemia linfoblastica acuta (LLA) (139). La sua determinazione viene condotta esclusivamente in LC-MS in quanto a causa delle sue caratteristiche chimico-fisiche non può esser tratta in gascromatografia. La struttura dell'Imatinib (MM: 493,60 u) è riportata in Figura 60.

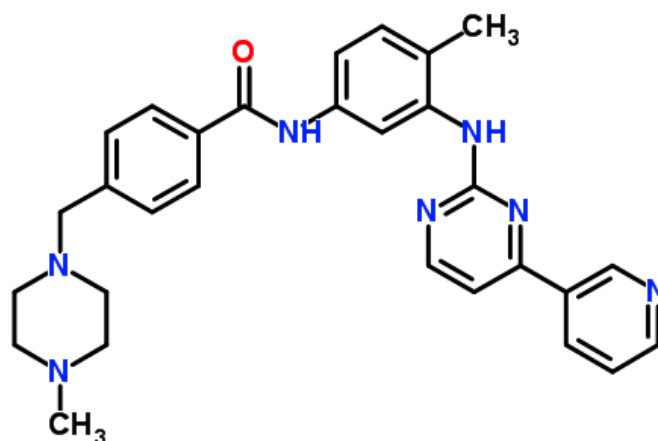


Figura 60. Formula di struttura scheletrica dell'Imatinib.

Grazie al Liquid-El è stato possibile registrare lo spettro di massa a ionizzazione elettronica dell'Imatinib per la prima volta. Dall'interpretazione degli ioni è stato possibile ipotizzare una via di frammentazione e questa è risultata essere coerente con la struttura reale confermata attraverso esperimenti NMR. Questo è un risultato di enorme valore scientifico.

L'attenzione è stata posta anche sull'uso dello spettrometro dotato di Liquid-El come detector per cromatografia liquida. Una miscela standard 0,5 µg/mL di 6 pesticidi è stata analizzata con separazione a fase inversa in gradiente. I 6 analiti scelti sono ognuno il rappresentante di una determinata classe di composti e sono riportati di seguito: clomazone (isossazolo), paclobutrazol (triazolo fungicida), fludioxonil (fenilpirrolo), metholachlor (cloroacetanilide), pirimiphos methyl (fosforotioato) e tefluthrin (piretroide). Questi composti sono dotati di gruppi funzionali differenti e quindi il comportamento strumentale, date le loro diverse caratteristiche chimico fisiche è un aspetto da considerare. L'esperimento, il cui cromatogramma è riportato in Figura 61, è stato condotto alle seguenti condizioni:

Strumento HPLC: Agilent Infinity II 1290 + Nanodapter, fase mobile a composizione fissa (H₂O 97%:CH₃CN 3%):CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL). Colonna Agilent AdvanceBio mapping (75µm × 15cm, 2.7µm particle size).

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 400°C. Diametro del capillare: 50 µm, posizione impostata a 4 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione, ovvero in corrispondenza della parte più esterna del manicotto riscaldante.

Spettrometro di massa: Agilent 7010 con sorgente HES, sorgente EI a 280°C, acquisizione MRM.

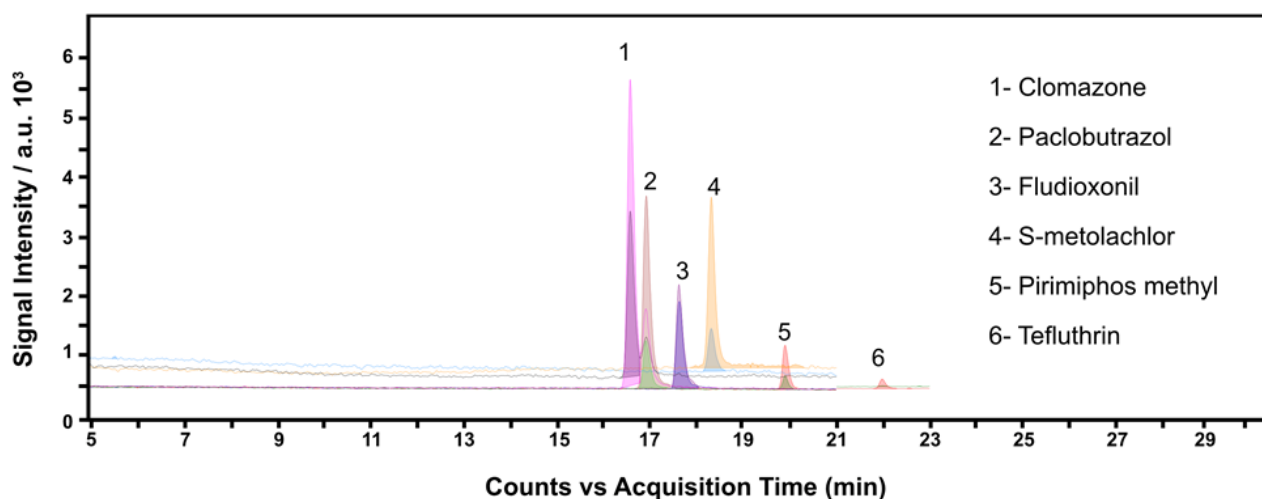


Figura 61. Cromatogramma MRM della miscela standard di pesticidi ottenuta in gradiente di flusso e composizione.

La separazione dei 6 componenti risulta soddisfacente sia in termini di simmetria del picco che di scodatura. Grazie all'acquisizione MRM ed all'ottimo funzionamento dell'interfaccia il rumore di fondo è particolarmente ridotto, fattore che enfatizza il rapporto S/N e migliora i limiti di

rivelabilità; in queste condizioni sperimentali il LOD risulta compreso tra 2.5 pg e 15 pg per i 6 composti studiati.

Sulla base dei risultati ottenuti con l'ultima versione, l'interfaccia ha raggiunto un livello di maturità sufficiente per condurre ricerche complesse e di lungo corso in applicazioni reali. Alcuni interessanti esperimenti saranno riportati nelle pagine seguenti.

USO DI UN'INTERFACCIA LIQUID-EI IN APPLICAZIONI CON APPROCCIO “DILUTE AND SHOOT”

ABSTRACT

Food safety, forensic analyses and quality control in personal care products (PCP) are analytical fields where mass spectrometry (MS) plays a fundamental role, especially when focused on a targeted approach. Most protocols are based on LC-ESI MS; however, the broad variability of this matrices need a dedicated method for every sample with an increase in complexity, time and material consumption. Liquid-EI (LEI) is an LC-MS interface for coupling liquid chromatography and electron ionization mass spectrometry. LEI provides the “fingerprint” spectrum of electron ionization (EI) for polar and non-polar analytes in the absence of matrix effect. Its highlights are of great potential for flexible and direct targeted and non-targeted approaches. Parabens are conservative compounds widely present in cosmetics, food, and beverages. Together with dimethyl phthalate, their chronic exposure is hazardous for human health. On the other hand, drug-facilitated crimes (DFC) are violence and robberies performed adulterating beverages with psychoactive substances. The “Mediterranean diet” is a healthy eating habit widely studied and known for reducing cardiovascular risks and other metabolic diseases. Extra Virgin Olive Oil (EVOO) is the most used fat in the Mediterranean diet. It is mainly made of mono-unsaturated fats, but it also contains other precious nutraceuticals such as anti-oxidative polyphenols like tyrosol and hydroxytyrosol. The quantification of these molecules is fundamental to assess product safety or quality or to identify a DFC. Conventional approaches based on LC-ESI are rigid making a fast and affordable determination of these compounds a challenging real-world application. In these applications, the LC apparatus is directly connected to the MS capillary, and all the injected molecules go inside the ion source together. An Agilent 1290 Infinity UHPLC fitted with an Agilent UHPLC Nanodapter coupled to 7010 QQQ triple quadrupole mass spectrometer equipped with a High-Efficiency Source (HES) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) is used. UHPLC Nanodapter primary flow: 90 μ L/min, flow on column: 525 nL/min. Injection volume: 10 nL. Mobile phase: 90:10% ACN:H₂O. Ion source temperature: 280 °C. Vaporization micro-channel temperature: 350 °C. Data acquisition: MRM. The samples are diluted (if needed) and analyzed in FIA mode without preliminary extraction. The MRM signal of the target compound is directly correlated to its concentration, regardless of the composition of the sample, thanks to the

absence of matrix effect. This advantage permits a dilute-and-shoot approach with an appreciable time and material saving. Parabens and dimethyl phthalate are directly determined in commercial merchandise, whereas flunitrazepam is dissolved in beverages to simulate equal-to-real samples. Finally, the direct determination of tyrosol and hydroxytyrosol in extra virgin olive oil is presented.

ESPERIMENTI QUANTITATIVI IN FLOW INJECTION ANALYSIS

Si definisce *Flow Injection Analysis* (FIA) la configurazione in cui tutte le molecole contenute nel volume di iniezione vengono trasportate al detector insieme (140). In questo caso, il ruolo del sistema di alimentazione della fase mobile, gassosa o liquida che sia, è quello di trasferire il contenuto del loop al detector; non a caso il significato di “flow injection analysis” è “analisi con iniezione in flusso”. Condurre esperimenti in FIA garantisce due vantaggi notevoli;

- La risposta strumentale è immediata, le molecole iniettate raggiungono il detector col tempo morto del sistema di alimentazione del flusso (qualche decina di secondi) (141).
- La riduzione dei tempi di analisi permette un incisivo abbattimento dei costi legati al consumo della fase mobile, la quale viene alimentata ai fini analitici per un tempo molto inferiore a quello necessario per l'eluizione cromatografica. Questo aspetto riesce a soddisfare contemporaneamente vari principi della GAC come riduzione dell'uso di solventi, riduzione del volume di scarti e riduzione dell'energia (non ci sono colonne da termostatare ed anche la pompa resta accesa per meno tempo) (142). L'assenza della colonna è un'altra voce di risparmio da considerare.

Contestualizzando la configurazione FIA all'uso di uno spettrometro di massa è evidente che dal punto di vista qualitativo non è possibile riconoscere alcun composto. Il segnale TIC sarebbe dato dalla somma della corrente ionica generata da tutti gli ioni di tutte le molecole, rendendo lo spettro impossibile da interpretare (143). Venendo a mancare anche l'informazione data dal tempo di ritenzione cromatografico nessuna valutazione qualitativa può essere fatta.

Dal punto di vista quantitativo la situazione è sensibilmente diversa; calibrando il sistema su uno ione o su una transizione MS/MS caratteristici ed intensi del composto da quantificare, è possibile determinarne la concentrazione. Siccome la ionizzazione avviene contestualmente alle molecole della matrice, è necessario operare con una tecnica di ionizzazione la cui efficienza non risente della loro presenza. Tutte le sorgenti con ionizzazione API sono inevitabilmente escluse.

Considerando le caratteristiche dell'interfaccia Liquid-El ed il fatto che non risente di effetto matrice, questa appare perfetta per lavorare correttamente in FIA.

Sono state condotte diverse applicazioni lavorando come descritto sopra e senza alcuna fase di preparazione del campione preliminare oltre all'eventuale diluizione (dilute-and-shoot). Le applicazioni sono state:

- Determinazione di flunitrazepam in residui di bevande alcoliche (vodka).
- Determinazione di ftalati (dietilftalato) in prodotti per la cura della persona (deodoranti).
- Determinazione di antiossidanti (tirosolo ed idrossitirosolo) nell'olio extra vergine d'oliva provenienti da varie regioni italiane (Marche, Puglia e Sicilia).

Nonostante si tratti di applicazioni che riguardano ambiti diversi, l'approccio sperimentale è stato fondamentalmente lo stesso (Figura



Figura 62. Procedura impiegata negli esperimenti FIA. Il tempo che intercorre tra la diluizione e la lettura del risultato è nell'ordine del minuto.

Il campione, reale o preparato ad hoc attraverso spiking della matrice, viene diluito ed iniettato direttamente senza trattamenti preliminari; al risparmio di tempo dato dalla configurazione FIA si va a sommare anche l'assenza della preparativa, con un'enfasi importante al carattere green del metodo. In tutte le applicazioni descritte la quantificazione è stata effettuata con il metodo delle aggiunte standard. Il risultato è stato poi confrontato con un analogo campione preparato con il solo analita in solvente ed analizzato con la stessa procedura per la verifica dell'effetto matrice.

Anche dal punto di vista delle condizioni sperimentali le differenze sono assolutamente minime; gli unici accorgimenti sono stati i diversi rapporti di diluizione per rendere la concentrazione dell'analita idonea alla quantificazione, e l'uso di uno spettrometro dotato di analizzatore a triplo quadrupolo per la matrice più complessa. L'uso di una ionizzazione fisica come la EI garantisce anche una notevole flessibilità.

DETERMINAZIONE DI FLUNITRAZEPAM IN RESIDUI DI ALCOLICI

I Drug Facilitated Crimes (DFCs) sono crimini condotti attraverso l'uso di sostanze inibitrici del sistema nervoso centrale; questi composti, usati come strumento del crimine al posto di armi da fuoco e oggetti contundenti, rendono la vittima incapace di reagire ad un qualsiasi tipo di aggressione, e facilitano le operazioni del criminale. A partire dai primi anni 30 i DFCs hanno cominciato a prendere piede per poi esplodere nell'ultimo trentennio; il motivo che ha determinato questo trend è il facile acquisto di sostanze illegali o farmaci con le caratteristiche adatte allo scopo criminale.

Proprio per questo motivo, tra i composti più utilizzati per DFCs ci sono le benzodiazepine. Queste sono il farmaco più consumato (e più abusato) al mondo e, nonostante siano somministrate principalmente per il trattamento dell'ansia nel medio – breve periodo, impiegate in quantità ben più massicce rispetto alla dose terapeutica provocano torpore, apnea a perdita di conoscenza. Per questo motivo, insieme a ketamina e GHB sono certamente i composti più frequentemente rinvenuti nei reperti da DFCs. Trattandosi di sostanze a media polarità e poco solubili in acqua, il loro consumo contestualmente ad alcol ne incrementa la biodisponibilità e gli effetti.

L'assunzione di sostanze psicotrope in dosi da DFCs viene condotta manipolando alimenti e, soprattutto, bevande che verranno consumate inconsciamente; in particolare per quest'ultime, successivamente al loro consumo, l'unico reperto rinvenibile sulla scena del crimine è un residuo sul fondo del bicchiere. Per l'analisi di reperti da DFC sono quindi necessarie tecniche analitiche performanti ed affidabili con ridotte quantità di campione in quanto il volume disponibile impedisce di ripetere l'analisi più volte.

Lo scopo della metodica presentata di seguito è la quantificazione del flunitrazepam solubilizzato in un campione di vodka preparato per replicare un ipotetico reperto da DFCs. La scelta del composto è ricaduta nel flunitrazepam perché si tratta della benzodiazepina dall'effetto più intenso ed è anche una delle più utilizzate in aggressioni di tipo DFCs. L'uso del flunitrazepam è solito nell'ambiente ospedaliero per la sedazione durante le operazioni chirurgiche o per il trattamento dell'insonnia. L'effetto di questa sostanza è però così intenso che il *Rohypnol*[®], farmaco prodotto da Roche di cui è principio attivo, è divenuto famoso come droga da stupro (*Drug Facilitated Sexual Assault*, DFSA). Per questo motivo la sua commercializzazione è stata

vietata negli Stati Uniti d'America (nel resto del mondo, Europa compresa, resta un farmaco legale). La struttura del flunitrazepam è riportata in Figura 63.

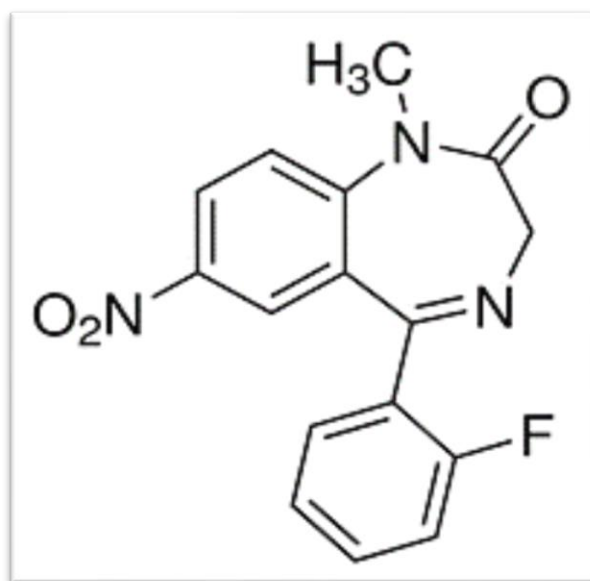


Figura 63. Formula di struttura scheletrica del flunitrazepam.

Un'aliquota di vodka commerciale è stata arricchita con del flunitrazepam (fornito dall'azienda ospedaliera Marche Nord di Ancona) a 25 µg/mL. Questa concentrazione è stata scelta in quanto frequentemente identificata in casi di DFCs. La vodka è stata scelta come bevanda da manipolare in quanto fortemente alcolica ed anche una tra quelle a maggior consumo a livello mondiale, sia tal quale che come base per cocktail. In questo caso, considerato che la vodka è principalmente composta da etanolo ed acqua, nessuna diluizione è stata necessaria. Le condizioni sperimentali sono riportate di seguito:

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O:CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL). Configurazione FIA. Triplice iniezione per ogni punto.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 400°C. Diametro del capillare: 30 µm, posizione impostata a 2.5 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (Q: 312, q₁: 285, q₂: 266, Dwell: 400, cycle/s: 0.81).

La stima della quantità di flunitrazepam è stata condotta col metodo delle aggiunte standard con iniezioni in triplicato per ogni punto, ed il risultato è riportato in Figura 64.

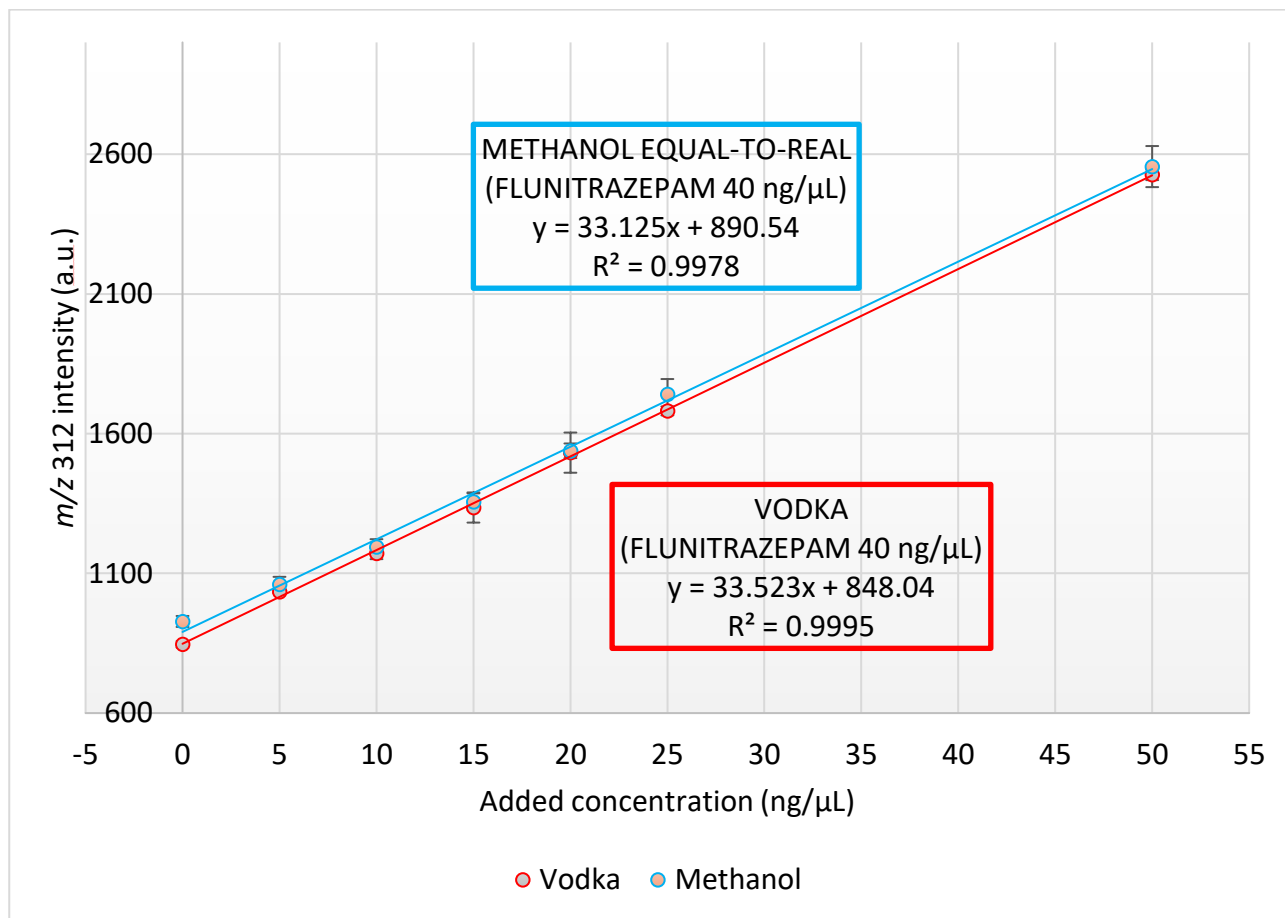


Figura 64. Curve di calibrazione acquisite col metodo delle aggiunte standard per il campione di flunitrazepam in vodka (rosso) e per l'equivalente in metanolo (blu).

La concentrazione è stata valutata in 25.3 μg/mL, valore molto vicino a quello reale e decisamente soddisfacente considerata la metodica semplice, veloce ed estremamente economica (non è stato utilizzato nessun costoso standard interno marcato isotopicamente). I limiti per il protocollo sviluppato sono stati LOD di 100 pg e LOQ di 200 pg, un risultato soddisfacente considerata l'assenza di cromatografia ed analizzatori di massa tandem.

La stessa procedura è stata replicata per un campione di flunitrazepam 25 μg/mL preparato questa volta in metanolo; in questo modo l'analita viene ionizzato con un intorno chimico completamente diverso ed è possibile valutare l'effetto matrice. La retta di calibrazione in blu riportata in Figura 64 mostra un comportamento pressoché identico a quello del campione di vodka (rosso) tanto in

termini di pendenza che di intercetta. La trascurabile differenza di quest'ultimo valore è attribuibile a qualche minimo errore umano dovuto alla diluizione. Al netto dei risultati mostrati, l'effetto matrice in questa applicazione risulta essere assente.

DETERMINAZIONE DI DIETILFTALATO IN PRODOTTI PER LA CURA DELLA PERSONA

Gli ftalati sono esteri dell'acido ftalico ampiamente diffusi nell'industria plastica come plastificanti, lubrificanti ed additivi in molti polimeri, prima su tutti il PVC (144). L'uso degli ftalati è molto comune, soprattutto per quanto concerne i più leggeri, come solventi per pesticidi e cosmetici (145); nei prodotti per la cura della persona svolgono spesso il ruolo di stabilizzatori, dispersori e conservanti (146). Il largo impiego di questa classe di composti rende la loro esposizione un fenomeno quotidiano ed ormai inevitabile. Approfonditi studi sono stati condotti sugli effetti degli ftalati nei confronti della salute dell'uomo, ed i risultati indicano un potenziale effetto di interferente endocrino (147). In particolare, gli studi di Tomonari et al. ed altri, hanno dimostrato effetti nello sviluppo dei caratteri primari maschili (148) e femminili (149) oltre che in fenomeni di aborto spontaneo in donne sottoposte a fecondazione assistita (150). Sia il governo degli USA con l'azione del FDA (Food and Drug Administration) che l'Unione Europea si stanno muovendo nella limitazione di uso e produzione di alcuni ftalati, ma per la maggior parte di loro non vi sono restrizioni (151) (152).

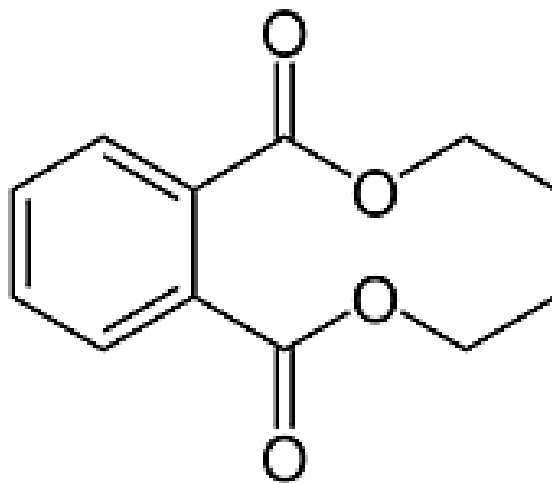


Figura 65. Formula di struttura scheletrica del dietilftalato.

Questa applicazione è stata focalizzata in uno degli ftalati più utilizzati nel campo dei prodotti per la cura della persona, ossia il dietilftalato (Figura 65). Come campione è stato scelto un deodorante spray acquistato al supermercato sulla cui etichetta era riportata la presenza di questo composto. Il prodotto è stato quindi erogato in un vial ed il liquido prelevato e diluito con in rapporto 1:400 in

CH₃CN. Il campione risultante è stato infine analizzato ripetendo la procedura “dilute-and-shoot” descritta in precedenza. Le condizioni sperimentali sono riportate di seguito:

Strumento HPLC: Agilent 1290 nano, fase mobile a composizione fissa H₂O:CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.4 µL/min, iniettore manuale (10 nL). Configurazione FIA. Triplice iniezione per ogni punto.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 400°C. Diametro del capillare: 30 µm, posizione impostata a 2.5 cm dall’ingresso della camera di vaporizzazione.

Spettrometro di massa: Agilent 5975, sorgente EI a 280°C, acquisizione SIM (Q: 177, q₁: 149, q₂: 105, Dwell: 400, cycle/s: 0.81).

Usando il metodo delle aggiunte standard la concentrazione di dietilftalato nel liquido del deodorante è stata stimata in 3250 µg/mL, una quantità molto elevata ma compatibile con la funzione del composto nel prodotto. La retta di taratura è riportata in Figura 66.

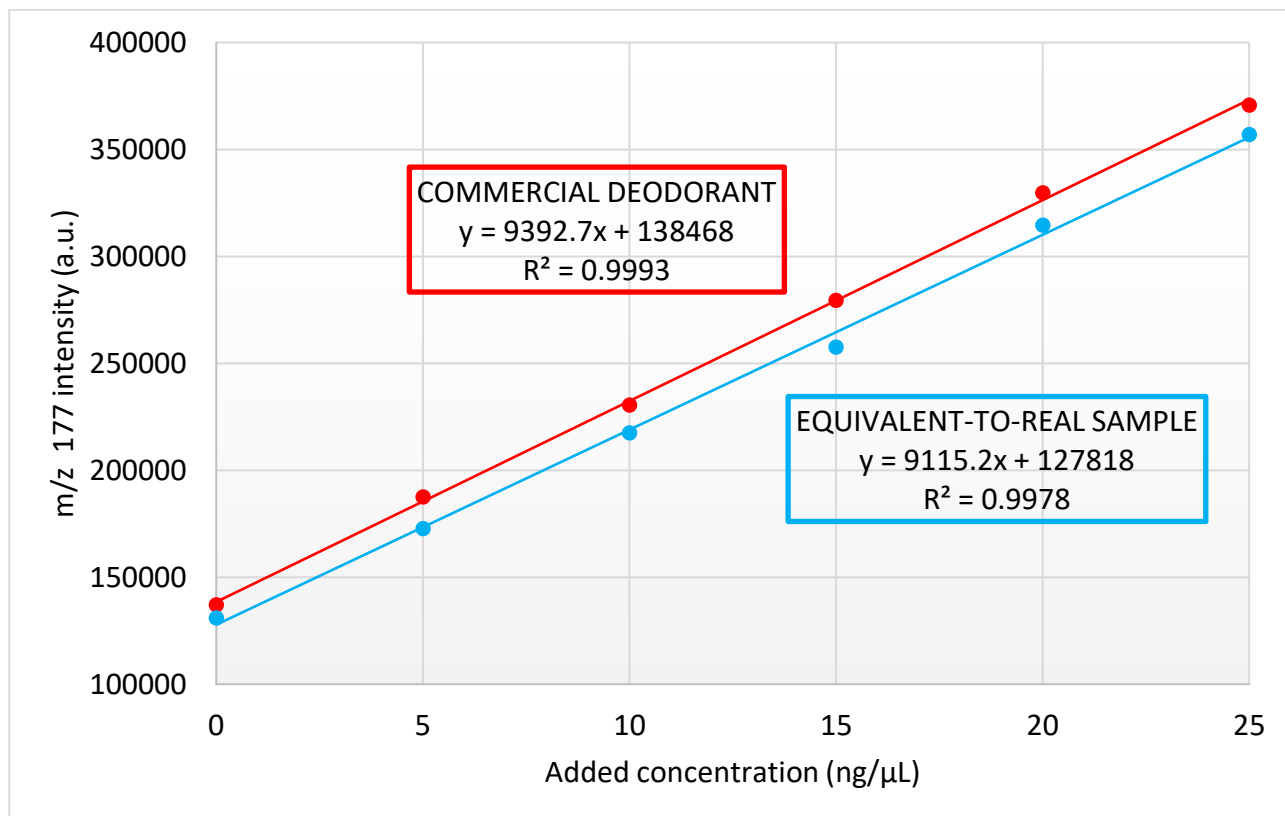


Figura 66. Curve di calibrazione acquisite col metodo delle aggiunte standard per il campione di dietilftalato in deodorante spray (rosso) e per l’equivalente in CH₃CN (blu).

Per la valutazione dell'effetto matrice è stato preparato un campione 3250 µg/mL di dietilftalato in CH₃CN ed analizzato seguendo lo stesso iter del deodorante. La retta di calibrazione in blu riportata in Figura 66 ha un'intercetta molto simile alla retta del deodorante (rosso) ed una pendenza pressoché identica. Trattandosi di un campione reale, l'elevato grado di affidabilità della quantificazione anche con quantità così elevate è un risultato importante. LOD e LOQ del metodo presentato sono stati valutati come S/N 3 e 10 per il m/z 105, e corrispondono rispettivamente a 1 pg e 2pg di dietilftalato. Anche in questo caso l'esperimento è stato condotto con un semplice strumento a singolo quadrupolo, quindi i limiti LOD e LOQ risultano eccellenti oltre che migliori delle aspettative. Al netto dei risultati mostrati, l'effetto matrice in questa applicazione risulta trascurabile ed il range di concentrazioni quantificabili con affidabilità molto ampio anche senza l'uso di costosi standard interni.

DETERMINAZIONE DI IDROSSITIRSOLO E TIROSOLO IN CAMPIONI DI OLIO EXTRAVERGINE D'OLIVA

La dieta mediterranea è un insieme di abitudini alimentari tipiche di tutti i paesi bagnati dal mar Mediterraneo come Spagna, Italia e Grecia (153). Gli alimenti fondamentali di questo approccio sono legumi, cereali integrali, pesce ed olio d'oliva (154). In particolare, l'olio extravergine d'oliva è un olio di elevatissima qualità, prodotto per spremitura a freddo della polpa di olive; in questo modo tutte le molecole estratte non vengono sottoposte ad alcuno stress e l'olio dispone di tutti i micronutrienti contenuti nelle olive. Ci sono evidenze scientifiche che, proprio grazie a queste molecole, l'olio extravergine è il principale promotore degli effetti benefici della dieta mediterranea (155).

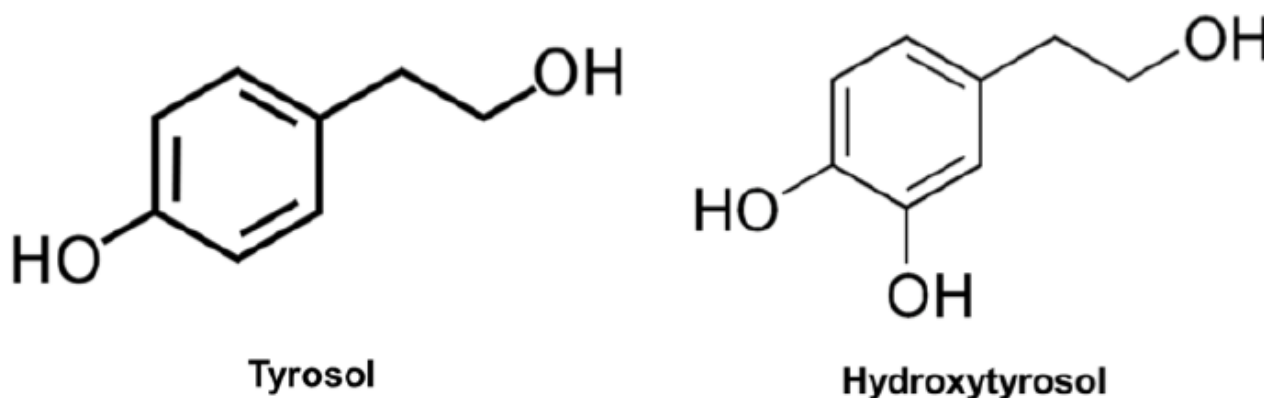


Figura 67. Formule di struttura scheletriche di tirosolo ed idrossitirosolo.

Tirosolo ed idrossitirosolo sono derivati fenolici che, nell'organismo umano, fungono da antiossidanti (156); queste due molecole sono preziose per la salute come protezione dallo stress ossidativo oltre che a livello cardiovascolare (157). La presenza di questi derivati fenolici in concentrazione pari o superiore a 1 mg/Kg è indicatore di una buona qualità dell'olio. Il Regolamento (UE) N. 432/2012 della commissione del 16 maggio 2012 certifica l'importanza di questi composti. Per godere a pieno del potere antiossidante di tirosolo ed idrossitirosolo è necessaria un'assunzione giornaliera di almeno 5 mg della somma dei due (158); considerato che il consumo di olio d'oliva medio pro-capite è di 20 g, la concentrazione di antiossidanti è espressa come mg/20 g di olio (159).

In questo esperimento tre diversi campioni di olio extravergine d'oliva sono stati analizzati per la quantificazione di tirosolo ed idrossitirosolo con la procedura "dilute-and-shoot". La complessità

della matrice, in questo caso, richiede due piccole accortezze: prima di tutto il campione è stato diluito con rapporto 1:100 in acetone, per evitare l'imbrattamento precoce della vaporization micro-channel. Data la ridotta concentrazione iniziale, la diluizione e la complessità della matrice, il volume di iniezione è stato elevato a 100 nL. Inoltre, in questo esperimento è stato utilizzato uno spettrometro con analizzatore a triplo quadrupolo per poter quantificare in MRM; questa è stata una scelta fondamentale per evitare ogni tipo di signal enhancement in SIM dovuto alla ionizzazione di composti isobari presenti nella matrice. Le condizioni sperimentali sono state:

Strumento HPLC: Agilent Infinity II 1290 + Nanodapter, fase mobile a composizione fissa (H₂O 97%: CH₃CN 3%):CH₃CN 10:90, portata volumetrica 0.525 µL/min, volume di iniezione 100 nL con iniezione manuale. Configurazione FIA. Triplice iniezione per ogni punto.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 400°C. Diametro del capillare: 50 µm, posizione impostata a 2.5 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione.

Spettrometro di massa: Agilent 7010 con sorgente HEIS, sorgente EI a 280°C, acquisizione MRM (Tirosolo Q 138 > 107, q 138 > 77; Idrossitirosolo Q 154 > 123, q 137 > 91; CE (eV) 10).

Sono stati analizzati tre diversi oli extravergine provenienti da Marche, Puglia e Sicilia, in modo da poter apprezzare le prestazioni dell'interfaccia con matrici diverse. Considerando che la Puglia è una delle regioni più famose per la produzione di olive e loro prodotti, il metodo è stato ottimizzato sul suo campione. I risultati per i tre oli sono riportati in Tabella 6.

EVOO origin	Hydroxytyrosol (mg/20g EVOO)	Tyrosol (mg/20g EVOO)
Marche	0.87 (± 12.5%)	4.39 (± 6.0%)
Puglia	2.33 (± 10.8%)	5.08 (± 5.7%)
Sicilia	1.31 (± 9.8%)	2.59 (± 6.6%)

Tabella 6. Concentrazione di tirosolo ed idrossitirosolo nei campioni di olio extravergine d'oliva.

Le concentrazioni ottenute sono ragionevoli e risultano in buon accordo con la qualità degli oli analizzati. Come riportato in Figura 67, l'idrossitirosolo dispone di 1 gruppo OH in più rispetto al tirosolo; questo gruppo funzionale contribuisce alle interazioni intermolecolari e con queste alla

temperatura di ebollizione. A causa della minor volatilità dell'idrossitirosolo questo composto presenta un'incertezza sulla misura di circa il doppio rispetto al tirosolo.

L'effetto matrice è stato valutato come negli altri casi andando a preparare un campione in solvente con i soli analiti alla concentrazione misurata. In questo caso, una soluzione dei due derivati fenolici è stata preparata alla concentrazione dell'olio pugliese, ed analizzata con lo stesso metodo "dilute-and-shoot". Le due curve di calibrazione del tirosolo sono riportate in Figura 68.

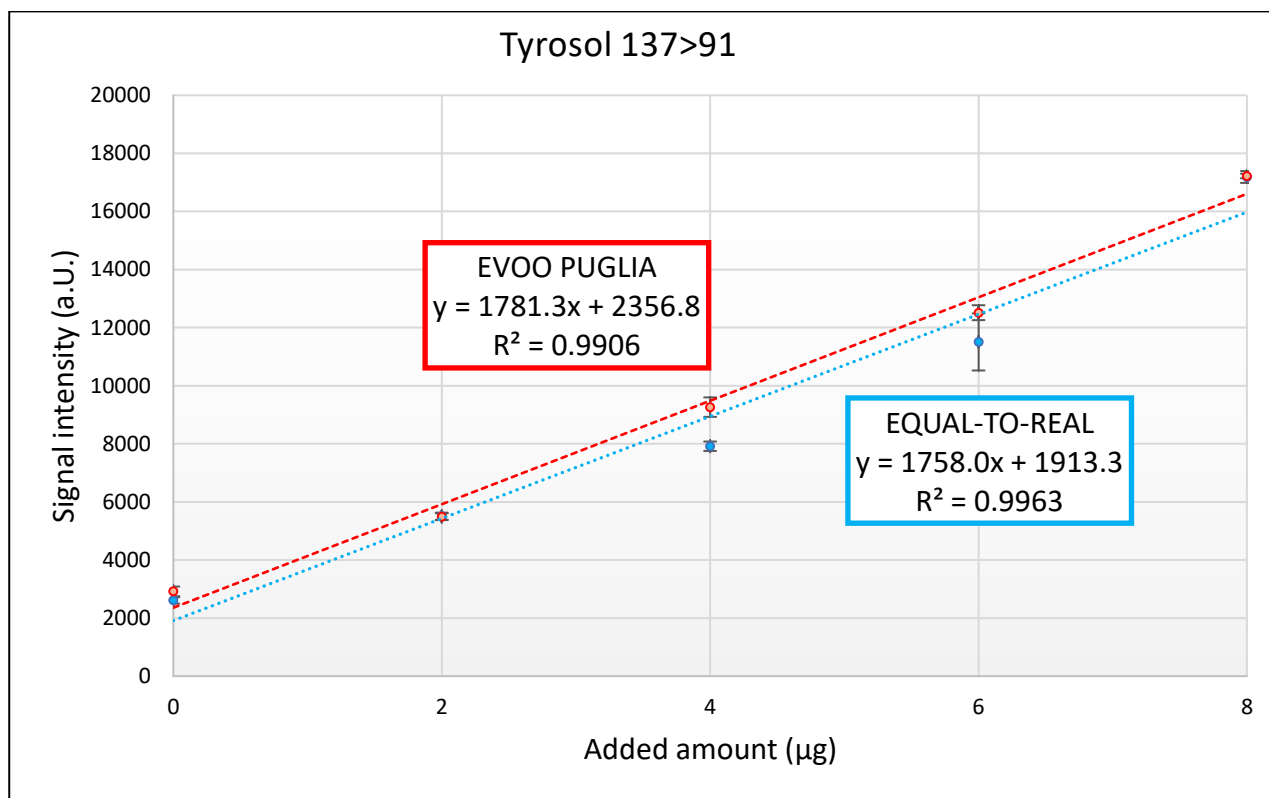


Figura 68. Curve di calibrazione acquisite col metodo delle aggiunte standard per il campione di tirosolo in olio extravergine d'oliva pugliese (rosso) e per l'equivalente in acetone (blu).

Le rette del tirosolo nelle due matrici risultano parallele, ovvero con la stessa pendenza ed una differenza di intercetta trascurabile. Il fatto che vaporizzazione e ionizzazione dell'analita avvengano con la stessa efficienza nonostante l'intorno chimico totalmente diverso e ricco di composti altobollenti è un risultato eccellente. Il risultato è stato possibile anche grazie all'acquisizione MRM che ne incrementa la selettività. Per quanto riguarda l'idrossitirosolo, in Figura 69 è possibile apprezzare lo stesso comportamento del tirosolo e di tutti gli altri composti nelle altre applicazioni. Nuovamente pendenza ed intercetta sono quasi uguali e quindi l'effetto matrice non risulta presente.

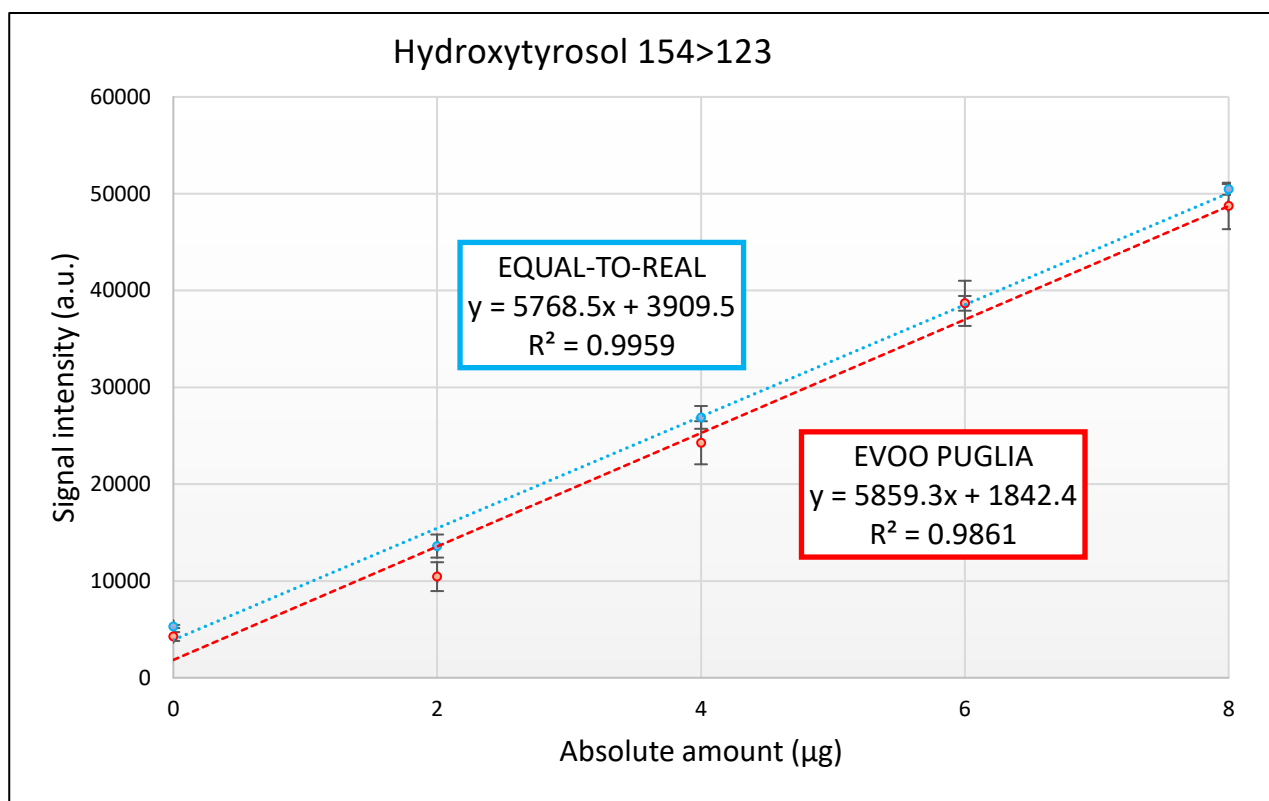


Figura 69. Curve di calibrazione acquisite col metodo delle aggiunte standard per il campione di idrossitirosolo in olio extravergine d'oliva pugliese (rosso) e per l'equivalente in acetone (blu).

Il fatto che anche l'idrossitirosolo, nonostante la presenza di ben 3 gruppi funzionali in grado di dare legame a idrogeno, riesca a vaporizzare e ionizzare con efficienza, dimostra il potenziale dell'interfaccia. La quantificazione è stata accurata anche senza standard interno ed indipendentemente alla complessità della matrice; questo è un risultato straordinario. L'esperimento è stato condotto con uno strumento totalmente diverso, dalla parte LC allo spettrometro, e questo dimostra l'estrema flessibilità dell'interfaccia.

Grazie a questi 3 esperimenti è stato possibile testare in applicazioni reali l'interfaccia ed i risultati sono sempre risultati soddisfacenti; prestazioni, affidabilità e stabilità sono parametri per cui la risposta in applicazioni reali è stata eccellente. L'interfaccia è risultata matura ed ha permesso lo sviluppo di un metodo quantitativo rapido, economico e dal carattere green.

I risultati descritti in questo capitolo sono stati presentati in anteprima al 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics tenutosi a San Diego dal 3 al 7 giugno 2018; l'elevato tasso di innovazione introdotta è valso l'onore di una presentazione orale dal titolo "Fast 'Dilute-

and-Shoot' Quantitative Detection of Targeted Compounds with a Liquid-El (LEI) LC-MS Interface in Food, Forensic, and PCP Applications” nella sessione “Food safety”.

Gli stessi dati sono stati divulgati anche al “XXVII Congress of the Analytical Chemistry Division” organizzato dalla divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana, e tenutosi a Bologna dal 16 al 20 settembre.

In entrambe le sedi congressuali il successo riscosso dall’approccio proposto e da tutti i vantaggi che garantisce, è valso un eccellente riscontro di pubblico ed una vivace discussione scientifica. Ulteriori esperimenti saranno eseguiti per validare la procedura e raccogliere gli ultimi dati mancanti prima di procedere alla stesura di un articolo dedicato.

MONITORAGGIO ONLINE DI REAZIONI CHIMICHE CON LA COMBINAZIONE DI MEMBRANE ED INTERFACCIA LIQUID-EI (CP-MIMS-LEI-MS/MS)

ABSTRACT

CP-MIMS uses semipermeable membrane (e.g. polydimethylsiloxane, PDMS) interfaces to make direct, online measurements in complex samples. Permeating analytes are transferred by a condensed (liquid) acceptor phase to an MS for detection and quantitation. The real-time monitoring capabilities of CP-MIMS are ideal for investigating dynamic processes in reacting systems. Neutral species diffuse through the membrane for detection and analysis, while charged and heterogeneous components (e.g., catalysts and reagents) are rejected. In LEI, a narrow capillary introduces a liquid nanoflow that is nebulized, vaporized, and introduced to an EI source. Ionization suppression from co-permeating compounds is effectively mitigated, and the MS selectively monitors individual reaction components. We present the first demonstration using CP-MIMS-LEI for online reaction monitoring in organic solvents. An HPLC pump was used to deliver a degassed methanol acceptor phase (100 μ L/min) through the lumen of a hollow fiber membrane (HFM) probe and to the MS. The PDMS membrane (0.30 mm ID, 0.64 mm OD, 170 μ m thick) was cut to be 5-20 mm long (length of membrane exposed to sample). Passive flow splitting post membrane probe reduced the flow to the liquid electron ionization (LEI) interface to \sim 50 nL/min, allowing direct analysis of high concentration (mM) solutions. A triple quadrupole MS/MS (Agilent 7010 QqQ) operated in MRM mode was used for online measurements. Reactions were conducted in 40 mL closed vials. Acceptor solvent and analytes were vaporized in the MS transfer line (350 $^{\circ}$ C), and the mass spectrometer source was maintained at 280 $^{\circ}$ C. Initial development of the system was aimed at reducing the analytical sensitivity without compromising the operation of the LEI source. Shortened HFM interfaces were explored to reduce the mass transport of analyte permeating into the acceptor phase, and reduced flows to the LEI vaporization capillary (\sim 50 nL/min) eliminated blockages in the capillary that can interrupt continuous measurements at higher flow rates (\sim 500 nL/min, is a more typical LEI flowrate). The current system has excellent

temporal response, comparable to other CP-MIMS experiments using other ion sources such as ESI. The choice of reaction solvent was crucial, given that it should not compromise the membrane integrity, and to date, methanol, isopropanol, and CH_3CN have proven successful. To assess online measurement stability for direct reaction monitoring, stirred 25 mM solution of chlorobenzene in methanol was monitored demonstrating a steady state signal without any performance degradation. As an initial demonstration of the technique, the hydration of phenylacetylene (90 mM) in methanol in the presence of a gold chloride catalyst to yield acetophenone was studied. The loss of reactant and the formation of the product were simultaneously monitored in real time at m/z 102 and 120, respectively. The online, direct monitoring of chemical reactions by CP-MIMS-LEI in non-aqueous, organic solvent (160).

MONITORAGGIO ONLINE DI REAZIONI DI CHIMICA ORGANICA IN SOLVENTI NON ACQUOSI

La comprensione delle cinetiche è un passaggio chiave nell'ottimizzazione delle condizioni di reazione in modo da massimizzare resa, conversione e selettività. Modelli matematici ed ordini di reazione vengono attualmente calcolati empiricamente attraverso il prelievo regolare di aliquote dall'ambiente di reazione e la loro analisi quantitativa. Registrando i valori in un grafico concentrazione/tempo è possibile interpolare i vari punti con una curva e trovare l'equazione matematica che meglio riesce a descriverne il comportamento (161).

In reazioni già studiate, il prelievo ed analisi ad intervalli regolari di tempo viene condotto per il monitoraggio del decorso di reazione; date condizioni ben precise, la corrispondenza tra valori attesi e valori ottenuti permette di verificare la regolarità del processo. Operando in questa maniera, trascorre un intervallo di tempo tra il prelievo e la conoscenza del valore; in pratica, anche lavorando senza tempi morti, il dato ottenuto è rappresentativo di una situazione precedente, e quindi intrinsecamente obsoleto. Inoltre l'andamento della reazione viene letto in maniera puntuale e non continua, fattore che determina una rappresentazione di quel che accade molto vicina alla realtà ma non perfettamente aderente (162).

Il monitoraggio online delle reazioni è una pratica piuttosto recente che ha preso piede soprattutto all'interno dei laboratori di ricerca. Molte applicazioni vengono condotte, anche in campo produttivo, con la variazione di un qualche parametro fisico correlato con la produzione di un prodotto o il consumo di un reagente; queste strategie sono valide solo per poche reazioni piuttosto elementari in quanto risultano poco specifiche e selettive (163). Nell'ambito della sintesi organica un'ottima alternativa agli approcci di cui sopra è la Risonanza Magnetica Nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) (164). Molte reazioni sono state condotte all'interno dei tubi per NMR in modo da poter monitorare la variazione di intensità di protoni o carboni interessati dalla reazione chimica (165). Le condizioni per il funzionamento dello strumento (temperatura, solvente, pressione) limitano fortemente la tipologia di reazioni monitorabili. Numerosi tentativi sono stati condotti utilizzando la spettrometria di massa; è questo l'unico detector in grado di garantire la necessaria specificità e selettività (166). Per poter operare su analiti solubilizzati in solventi liquidi vengono impiegate sorgenti API tra cui, principalmente, l'elettrospray (167). Come già descritto nell'introduzione, le tecniche di ionizzazione soft risentono maggiormente dell'effetto

matrice e, considerato che in questa configurazione non viene impiegata la cromatografia, è evidente che la risposta potrebbe non essere sufficientemente lineare o affidabile.

Un'alternativa promettente alle strategie elencate in precedenza, è l'impiego di membrane semipermeabili per l'introduzione diretta in spettrometria di massa (MIMS). Funzionamento, pregi e difetti di questa configurazione nelle misurazioni dirette sono già stati anticipati nell'introduzione; gli stessi punti di forza possono anche essere impiegati nella quantificazione diretta di molecole all'interno di un ambiente di reazione (168).

In questa applicazione un sistema di tipo CP-MIMS (Condensed Phase Membrane Introduction Mass Spectrometry) è stato abbinato ad uno spettrometro di massa a ionizzazione elettronica equipaggiato con l'interfaccia Liquid-El; la membrana veniva utilizzata per monitorare il decorrere di una reazione organica in solvente organico e catalisi basica. La rappresentazione schematica del sistema CP-MIMS-LEI LC/MS è riportata in Figura 70.

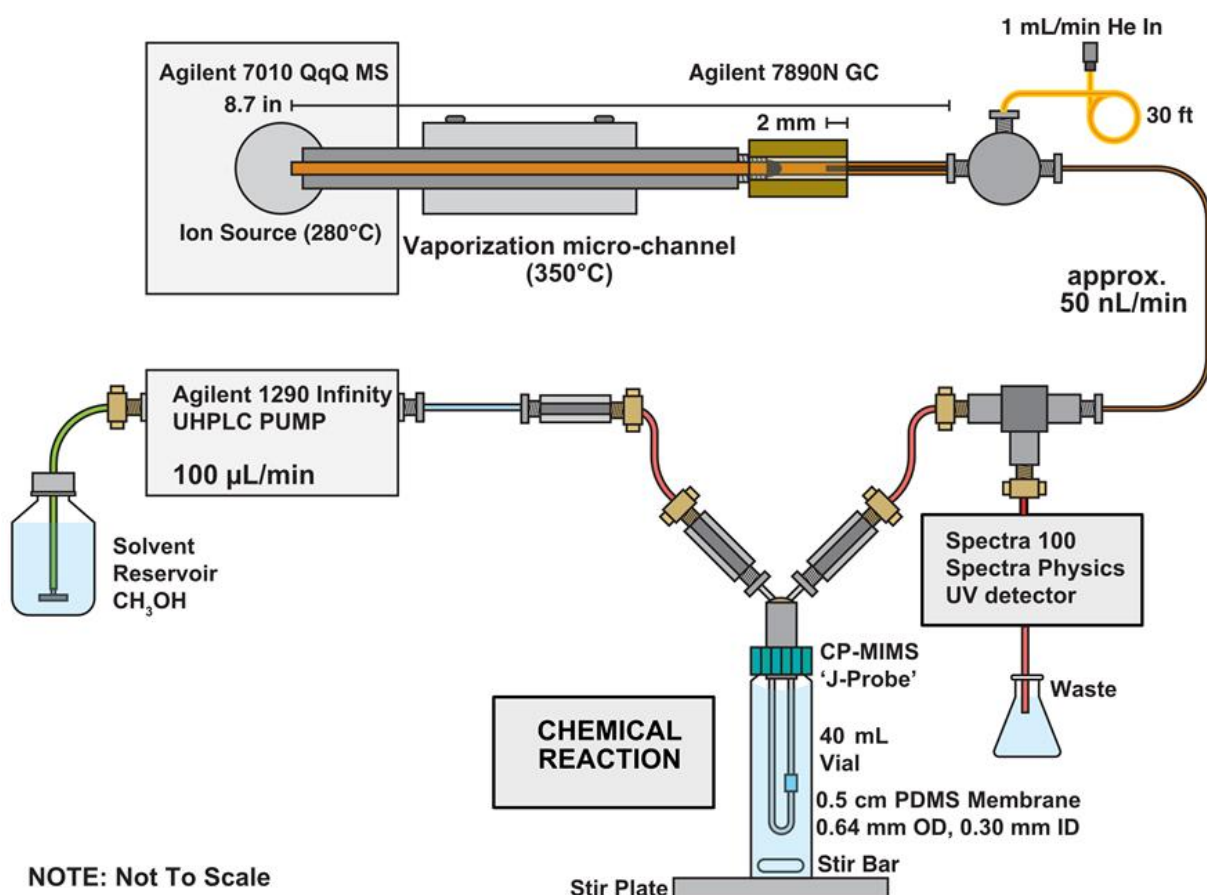


Figura 70. Schema di funzionamento della strumentazione usata nel monitoraggio della reazione organica.

La membrana viene immersa in un vial da 40 mL all'interno del quale vi sono ancoretta magnetica, reagenti, catalizzatore e solvente; al suo interno, un flusso di fase accettrice viene spinto da una pompa UHPLC a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. La membrana permette la permeazione degli analiti dal solvente alla fase accettrice governata dalle loro caratteristiche chimico fisiche. Di fatto si ha un fenomeno di ripartizione che però, a causa della continua alimentazione di fase mobile pura, non raggiunge mai l'equilibrio (Figura 71). La membrana, realizzata in polidimetilsilossano (PDMS), permette un fattore di arricchimento molto elevato come se ci fosse stata una preparativa ma senza gli svantaggi che ne conseguono. All'esterno della membrana è fondamentale un sistema di agitazione magnetica in grado di mantenere la concentrazione di tutti gli analiti omogenea in ogni punto del volume.

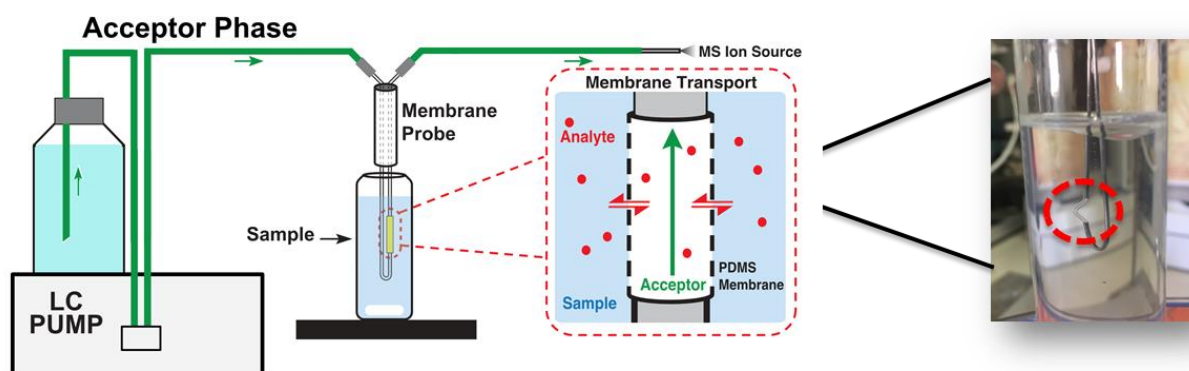


Figura 71. Schema del sistema della membrana e rappresentazione del passaggio degli analiti dal solvente alla fase accettrice (a sinistra); a destra, fotografia del sistema reale.

Il flusso, arricchito degli analiti in uscita dalla membrana, viene suddiviso in due frazioni da un punto separatore a tre vie: la frazione maggioritaria viene mandata ad una cella UV la cui uscita va allo scarico, mentre la frazione minoritaria (circa 50 nL/min) entra nel Liquid-El e da lì viene analizzato in EI.

Un primo studio di fattibilità nell'uso delle membrane in configurazione MIMS con il LEI è stato condotto dal gruppo di ricerca dei Prof. Christopher Gill ed Erik Krogh alla Vancouver Island University in Canada. Utilizzando uno spettrometro a singolo quadrupolo è stata monitorata un'addizione elettrofila in catalisi omogenea di acqua ad un alchino a dare un chetone; nello specifico si è idratato il fenilacetilene ad acetofenone in solvente misto $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ in presenza di acido cloraurico (catalizzatore) ed acido solforico. La cinetica è stata monitorata in SIM attraverso

l'acquisizione degli ioni caratteristici del fenilacetilene (m/z 102) e dell'acetofenone (m/z 120). Come reattore è stato usato un comune vial da 40 mL dotato di ancoretta magnetica e tappo forato per l'accesso della membrana MIMS in PDMS; in questa configurazione il recipiente di reazione è approssimabile ad un reattore CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*). L'andamento delle due correnti ioniche in funzione del tempo è riportato in Figura 72.

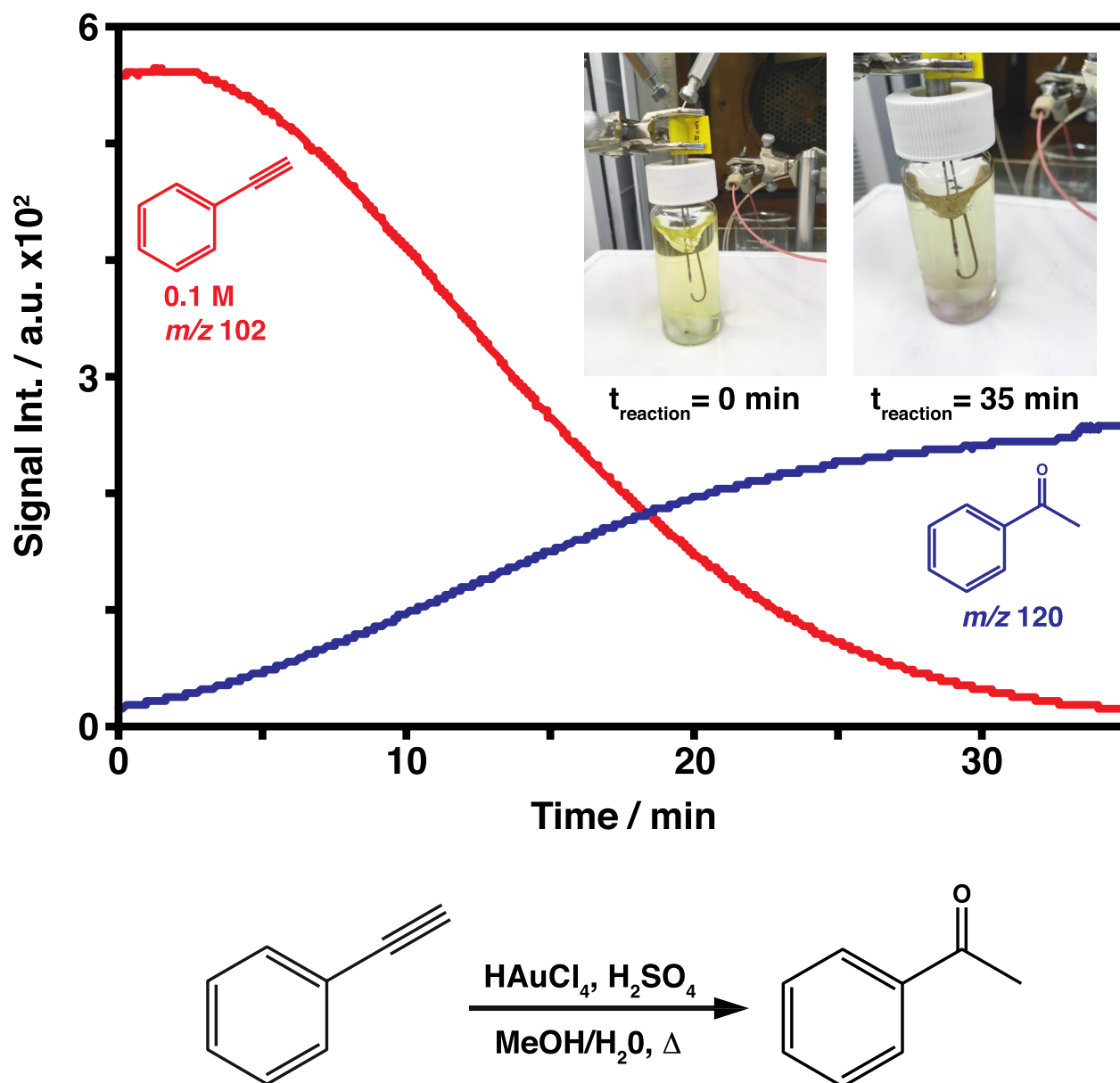


Figura 72. Andamento della corrente degli ioni di reagente (rosso, m/z 102) e del prodotto (blu, m/z 120) in funzione del tempo di reazione. Sotto è schematicamente riportata la reazione di idratazione studiata.

Il grafico mostra un andamento in linea con quello estrapolato matematicamente per questa tipologia di reazioni; dalla partenza della reazione si vede immediatamente il reagente calare e

contestualmente il segnale del prodotto alzarsi. I due segnali sono in scala in quanto sono riportati i valori della corrente ionica e non la concentrazione. Il sistema CP-MIMS-LEI dimostra di funzionare molto bene anche in accoppiata con reazioni di chimica organica in solventi acquosi.

La reazione scelta per l'esperimento di online monitoring è stata l'alchilazione selettiva di un'ammina primaria ad ammina secondaria. Questa è una S_N2 , ovvero una reazione di sostituzione nucleofila che si compone di un unico passaggio in cui partecipano entrambi i reagenti, nucleofilo e substrato; per questo motivo la reazione ha cinetica bimolecolare ed ha una velocità che dipende dalla concentrazione di entrambi. Le S_N2 sono reazioni molto usate grazie alla loro selettività, velocità ed alla enantioselettività (qualora la sostituzione avvenga in un atomo chirale questo vede invertirsi il descrittore R/S). Le ammine, sotto questo punto di vista, sono un'eccezione che conferma la regola; usando un'ammina come nucleofilo per sostituire un qualche gruppo uscente in una catena alchilica, il prodotto sarà un'altra ammina in cui la stessa catena alchilica sarà legata all'azoto. In questo modo il prodotto risulta più nucleofilo del reagente stesso quindi, in grado di competere con il reagente nell'attacco al substrato. La ulteriore sostituzione è una reazione consecutiva che affligge la resa nella reazione principale. Per questo motivo, mentre per le ammine primarie vengono usate la sintesi di Gabriel o varie altre strategie, la sintesi delle ammine secondarie resta una reazione complessa da condurre in modo efficiente. Grazie alla collaborazione col gruppo del Prof. Giovanni Zappia del Dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università di Urbino è stata individuata una alchilazione di notevole interesse scientifico da studiare col sistema CP-MIMS-LEI. Nel corso dell'esperimento è stata monitorata la seguente alchilazione (Figura 73).

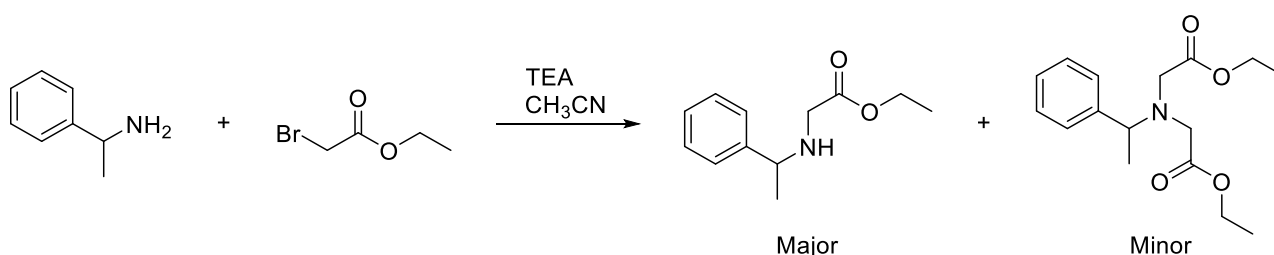


Figura 73. Reazione tra α -etilbenzilammina e α -etil bromoacetato in CH_3CN e catalisi basica (triethylammina, TEA) omogenea; il prodotto principale di monoalchilazione è l'ammina secondaria ma anche una piccola quantità di ammina terziaria bis-alchilata viene prodotta. Sali d'ammonio da tri-alchilazione sono esclusi per ingombro sterico.

Per un corretto decorso, le SN2 necessitano di un solvente polare aprotico, ovvero privo di protoni acidi che potrebbero andare ad interagire con il doppietto del nucleofilo sottraendolo alla reazione. Solventi di questo tipo sono inadatti all'uso con membrane di PDMS a causa del rigonfiamento e deformazione della stessa che andrebbero a indurre; questo è uno dei motivi per cui la configurazione MIMS è tipica di miscele acquose. A seguito di varie prove con alcuni solventi organici debolmente polari, il miglior compromesso tra stabilità della membrana e prestazioni della reazione è stato individuato nel CH₃CN.

Una volta individuato il miglior solvente, la reazione è stata monitorata con un sistema composto come di seguito:

Strumento HPLC: Agilent Infinity II 1290, fase accettatrice 100% CH₃OH, portata 0.1 mL/min.

Interfaccia: flusso di elio impostato a 1 mL/min, temperatura camera di vaporizzazione 400°C. Diametro del capillare: 50 µm, posizione impostata a 2.5 cm dall'ingresso della camera di vaporizzazione.

Spettrometro di massa: Agilent 7010 con sorgente HEIS, sorgente EI a 280°C, acquisizione MRM (α-etilbenzilammina Q 106 > 79, q 106 > 77; α-etil bromoacetato Q 121 > 93, q 138 > 120; ammina secondaria prodotto di mono alchilazione Q 192 > 91, q 192 > 118; ammina terziaria sottoprodotto di bis alchilazione Q 220 > 105, q 278 > 107; CE (eV) 10).

Reazione: α-etilbenzilammina (320 mM) e α-etil bromoacetato (350 mM), solvente CH₃CN grado HPLC disidratato con zeoliti igroscopiche (26 mL), trietilammina (1 mL), reattore CSTR da 40 mL agitato magneticamente, membrana Silicone™, 0.5 cm, 0.64 mm O.D., 0.30 mm I.D.

Il risultato è riportato in Figura 74 ed è coerente con quanto visto nell'esperimento per l'idratazione del fenilacetilene; in questo caso vi sono ulteriori variabili quali l'uso di un solvente organico e l'acquisizione MRM, quindi la qualità del segnale è un ulteriore passo avanti. Interessante notare come il segnale MRM incrementi immediatamente dopo l'iniezione dei reagenti nel reattore (t = 7,5 min, t = 15,5 min) dimostrando la minima latenza di risposta in caso di sollecitazioni. Il segnale del prodotto di alchilazione consecutiva viene presentato amplificato di 10 volte per poterlo rendere visibile in grafico; alle condizioni di reazione, complice anche lo sbilanciamento del rapporto molare verso l'elettrofilo (350 mM vs 320 mM) e le concentrazioni molto basse, la reazione di polialchilazione è minimizzata.

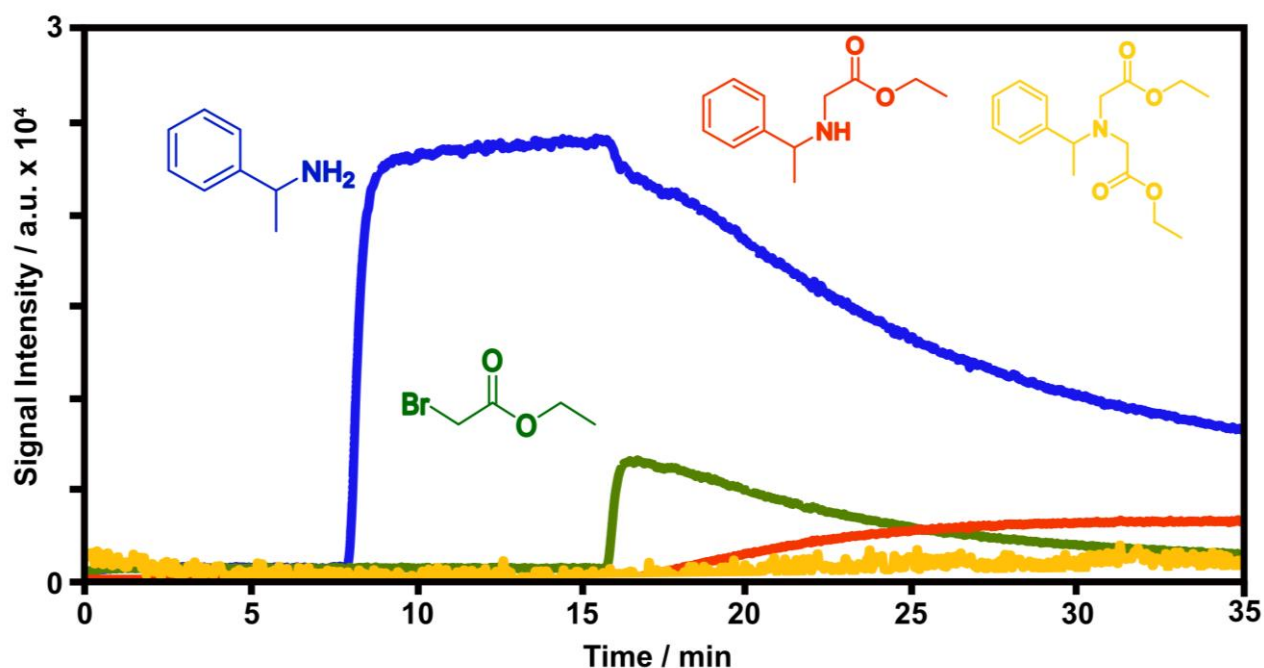


Figura 74. Andamento dei segnali dei 2 reagenti e dei 2 prodotti; si è scelto di mostrare le correnti ioniche da prima delle aggiunte in modo da vedere l'incremento dovuto ad ogni singolo reagente nell'ambiente di reazione.

Per poter correlare le intensità dei segnali con le concentrazioni è stato necessario registrare delle rette di calibrazione. Diversamente dalle configurazioni convenzionali dove viene prodotto un picco la cui area è proporzionale alla massa di analita, in questo caso si è dovuto ricorrere all'intensità del segnale. Le rette di taratura sono riportate in Figura 75.

Le rette sono state acquisite alle condizioni sperimentali riportate per l'esperimento a partire dal reattore con agitatore, solvente e catalizzatore. I vari punti sono il frutto di aggiunte di soluzione standard concentrata del composto da calibrare. I due prodotti non sono disponibili sul mercato come standard di riferimento e quindi si è dovuto procedere a separare in cromatografia su colonna un liquido di reazione reagito; a causa delle elevate quantità richieste per la calibrazione e delle ridotte quantità prodotte soprattutto di ammina terziaria, non è stato possibile acquisire tutti i 5 punti come per i due reagenti. Il fatto è accettabile in quanto la calibrazione viene effettuata comunque nell'intorno di concentrazioni attese. Per ogni composto la calibrazione è stata replicata in triplicato in modo da registrare la deviazione standard dei vari punti. I risultati sono molto buoni, con una ridotta incertezza associata alla misura e dei coefficienti di correlazione R^2 compresi tra 0.9988 e 1, ovvero molto soddisfacenti.

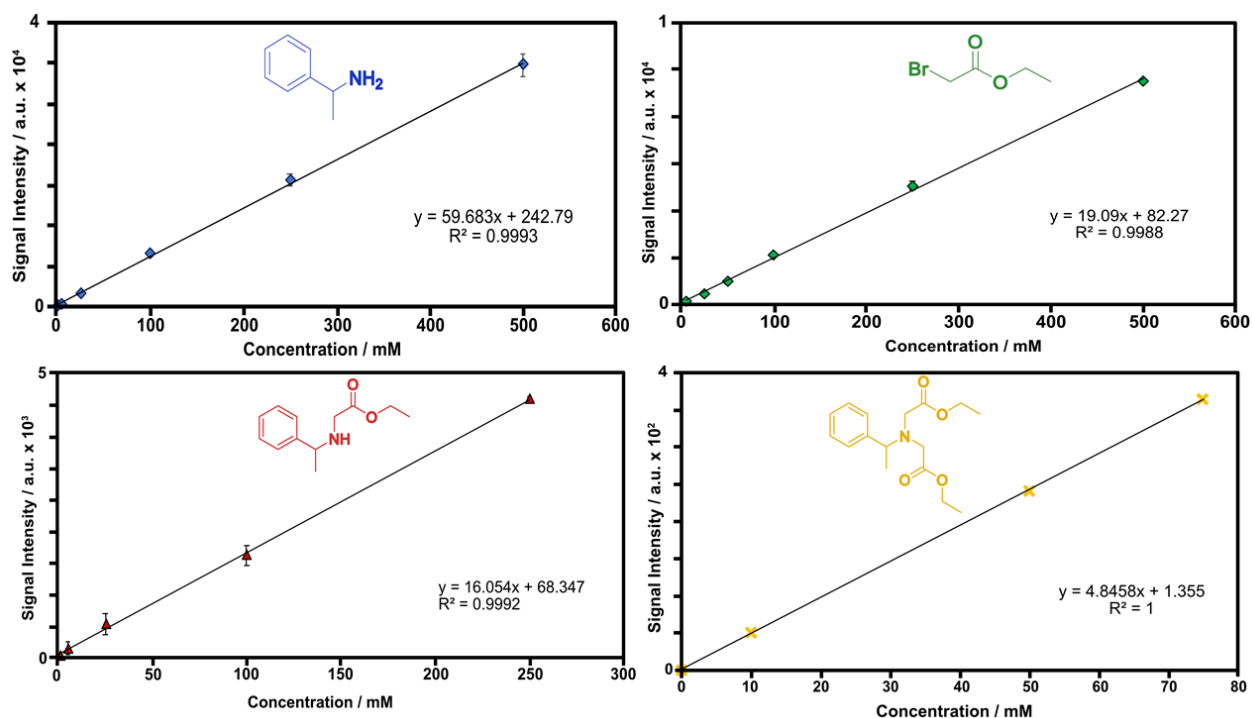


Figura 75. Curve di calibrazione dei due reagenti e dei due prodotti. Per i reagenti sono stati usati standard commerciali mentre per i prodotti si è dovuto ricorrere a quanto sintetizzato in laboratorio.

Per i quattro composti è stato valutato anche il $t_{10-90\%}$, ovvero il tempo necessario al segnale per passare dal 10% al 90% del valore relativo a seguito di un'aggiunta. Questo parametro è strettamente legato all'efficienza della membrana ed all'affinità delle molecole nel solvente per la fase accettrice. L'ideale per le applicazioni MIMS è avere un $t_{10-90\%}$ quanto più ridotto possibile, in modo da ridurre la latenza tra perturbazione e lettura strumentale della stessa. I $t_{10-90\%}$ per i quattro composti sono stati:

- α -etilbenzilammina $\rightarrow t_{10-90\%} = 0.32$ min
- α -etilbromoacetato $\rightarrow t_{10-90\%} = 0.23$ min
- ammina secondaria prodotto di mono alchilazione $\rightarrow t_{10-90\%} = 1.05$ min
- ammina terziaria sottoprodotto di bis alchilazione $\rightarrow t_{10-90\%} = 1.98$ min

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto atteso; la permeazione delle quattro molecole va in ordine dimensionale, con la risposta più rapida per i due reagenti seguita dal prodotto di mono-alchilazione e da quello di bis-alchilazione, in ordine di ingombro sterico crescente. Comparando i reagenti α -etilbenzilammina e α -etilbromoacetato, la prima ha una permeazione leggermente più lenta a causa della maggior polarità e della capacità di instaurare legami a idrogeno nonostante la massa molare inferiore.

Grazie alla conoscenza di questi valori ed alle rette di calibrazione è stato possibile quantificare i composti e riformulare il grafico come andamento delle concentrazioni in funzione del tempo (Figura 76).

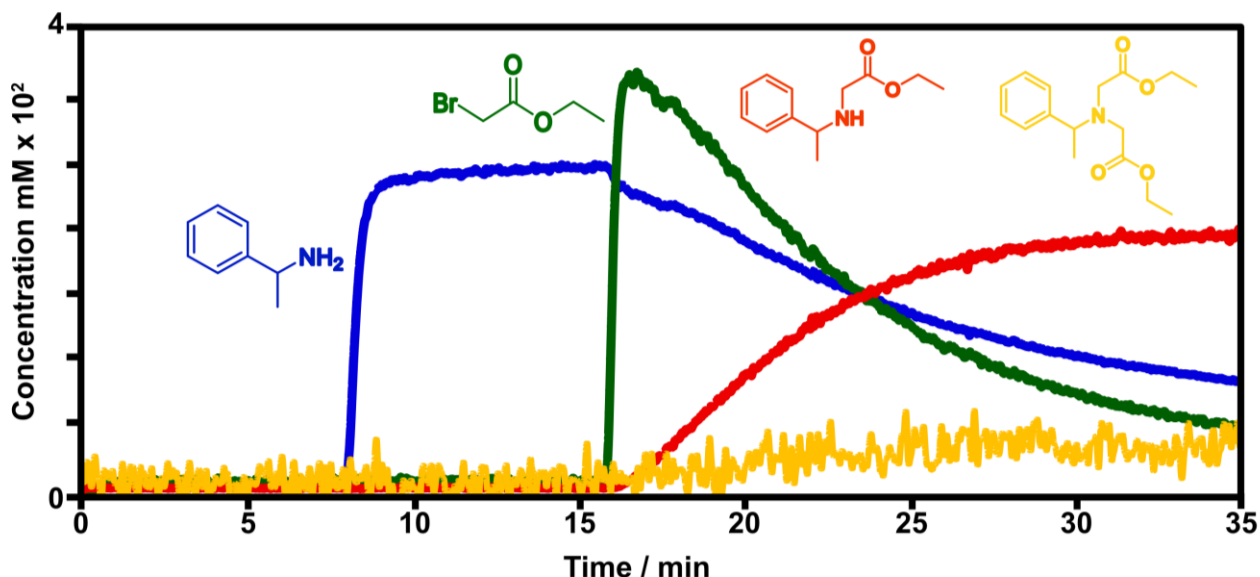


Figura 76. Grafico della concentrazione (mM) in funzione del tempo (min) per i due reagenti ed i due prodotti.

Questo picco di concentrazione dura pochi secondi e viene seguito da una stabilizzazione a livelli di concentrazione realistici; in questo caso, il plateau non è visibile a causa della partenza della reazione che consuma i reagenti. Nel momento in cui si perfeziona l'iniezione del secondo reagente si nota immediatamente la diminuzione della concentrazione del α -etilbenzilammina e l'aumento del segnale del prodotto di mono-alkilazione. Il prodotto di bis-alkilazione ha un'incidenza minima grazie alle condizioni di reazione ottimizzate per la massima resa nell'ammina secondaria; la sua concentrazione aumenta debolmente a partire dai 20 minuti anche se, complice la scarsa quantità residua di α -etilbromoacetato, resta a poco apprezzabile.

Grazie ai valori di concentrazione è stata calcolata la resa nel prodotto di mono-alkilazione in funzione del tempo (Figura 77). Data la minima formazione di prodotto di bis-alkilazione, la resa nel prodotto principale coincide con la conversione. Per il calcolo della resa è stata utilizzata la seguente formula (tra parentesi quadre sono indicate le concentrazioni mM):

$$YIELD (\%) \frac{[MONO - ALKYLATED]}{[\alpha - ETHYLBENZYLAMINE]} * 100$$

Mono-alkylated product YIELD (%)

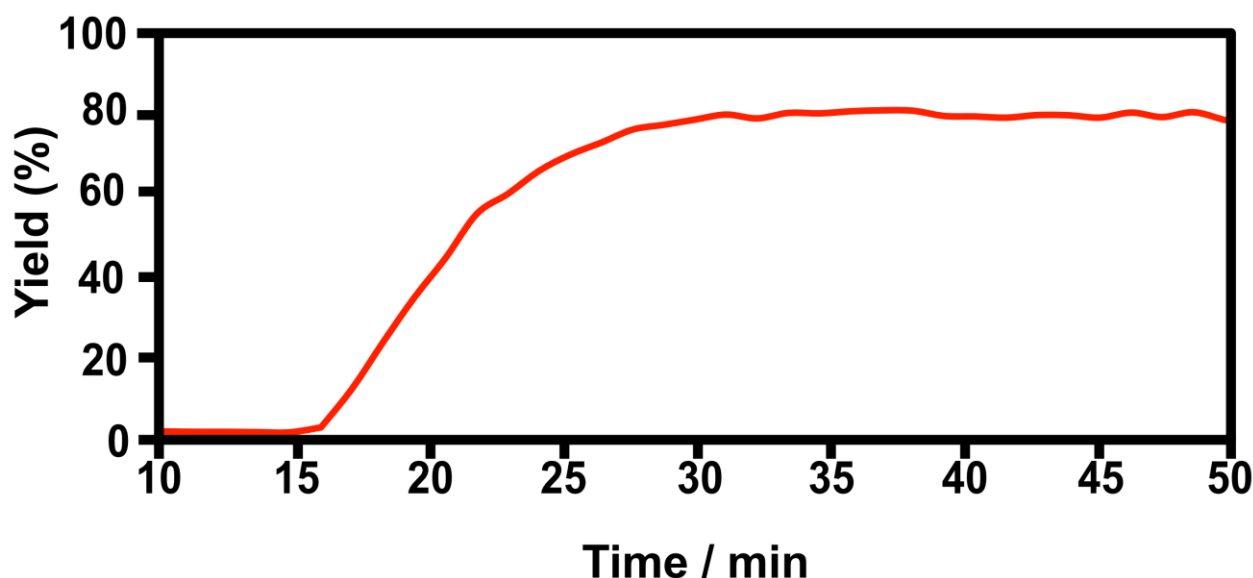


Figura 77. Andamento della resa nel prodotto di mono-alchilazione in funzione del tempo.

La massima resa è del 79% e corrisponde al minuto 39 del grafico, ovvero 22 minuti dall'inizio della reazione. Oltrepassato questo tempo, grazie alla elevata concentrazione di ammina secondaria e ridotta concentrazione di α -etilbenzilammina, la bis-alchilazione converte parte del prodotto in ammina terziaria e la resa cala leggermente.

L'utilizzo di membrane CP-MIMS con l'interfaccia Liquid-El ha confermato le attese ed è risultata essere una combinazione con un elevatissimo potenziale nel monitoraggio online di reazioni chimiche. Con un'adeguata scelta del solvente, anche reazioni in ambiente non-acquoso possono essere seguite con accuratezza e fedeltà di risposta. Grazie all'uso di un detector con minimo effetto matrice la risposta strumentale non viene influenzata né dalla compresenza di altre molecole con caratteristiche chimiche particolari, né dalla natura dell'analita. L'interfaccia LEI si è dimostrata assolutamente adatta allo scopo ed anche molto affidabile, senza mai richiedere manutenzioni supplementari durante il periodo degli esperimenti (circa 3 mesi). La possibilità di utilizzare la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica anche in queste applicazioni prive di cromatografia ne estende i pregi anche al di fuori degli ambiti convenzionali; in tutto ciò, l'interfaccia dimostra una flessibilità di assoluto rilievo.

CONCLUSIONI

Una nuova interfaccia per la combinazione della spettrometria di massa a ionizzazione elettronica e la cromatografia liquida è stata inventata; la spinta nello sviluppo di questo progetto è stata il voler superare alcuni limiti delle sorgenti API tipiche della LC-MS convenzionale estendendole i vantaggi delle sorgenti EI tipiche della GC-MS. L'interfaccia, il cui sviluppo dall'idea al brevetto è durato oltre due anni e ben tre prototipi con prestazioni ed affidabilità crescenti, si presenta come un modulo che permette di accoppiare qualsiasi spettrometro di massa EI ad effluenti liquidi.

Varie prove sono state condotte per trovare i migliori compromessi in termini di componentistica tra prestazioni ed affidabilità. Con le varie versioni dell'interfaccia sono stati fatti svariati esperimenti sia in abbinamento a spettrometri a triplo quadrupolo che a singolo quadrupolo, dimostrando inoltre un'elevata flessibilità. Anche diversi sistemi HPLC sono stati impiegati, sia in versione nano che dotati di splitter o meglio ancora di componenti dedicate come il Nanodapter di Agilent. I risultati sono sempre risultati essere insensibili alla composizione della fase mobile, poco influenzati dalla portata e con effetto matrice trascurabile. Inoltre è possibile interporre una cella UV-Vis tra l'ingresso del liquido e l'ingresso allo spettrometro; nei vari esperimenti condotti con cromatografia l'ampiezza dei picchi e la loro forma è la stessa sia al detector spettrofotometrico che con il LEI, mostrando nessuna influenza dell'interfaccia nel risultato cromatografico.

Dal punto di vista qualitativo gli spettri registrati con acquisizione scan si sono dimostrati in perfetto accordo con quelli della libreria NIST ed è stato anche possibile registrare spettri di molecole mai analizzate con sorgenti EI. Dal punto di vista quantitativo sono stati condotti vari esperimenti sia con separazione cromatografica che in FIA oltre che in abbinamento a membrane MIMS. In tutte le circostanze il LEI si è dimostrato affidabile, stabile, con una buona riproducibilità, accurato nella quantificazione anche senza l'uso di standard interni marcati isotopicamente e con effetto matrice trascurabile. I risultati sono stati discussi nei principali congressi di chimica analitica, cromatografia e spettrometria di massa a livello nazionale e mondiale, con un eccellente riscontro da parte della comunità scientifica; riscontro che è valso la vittoria del premio TASIA e la possibilità di divulgare l'invenzione con ben due presentazioni orali alla conferenza annuale della società americana di spettrometria di massa tenutosi a San Diego.

In attesa di nuovi sviluppi, l'interfaccia e le sue applicazioni sono state oggetto di un articolo su Analytical Chemistry, uno è attualmente in revisione ed altri due verranno presto completati.

CAPITOLO 2: SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO GREEN PER L'ESTRAZIONE IN SCALA MICRO DI BENZODIAZEPINE DA RESIDUI DI BEVANDE

ABSTRACT

Microextraction by packed sorbent (MEPS) and Dispersive Liquid–Liquid Micro Extraction (DLLME) with and without ultrasound assistance (UA-DLLME) were used as “green” extraction methods for the determination of benzodiazepines (BDZ) in beverages followed by HPLC-UV detection. BDZ are pharmaceutical compounds usually employed for their tranquilizing and anti-depressive effect. However, their simple availability and reduced cost make them attractive for criminal intent. The very low amount of sample usually available for the analyses makes the determination suitable for micro–scale extraction techniques. MEPS and DLLME are emerging techniques based on different principles, and they can be considered “green” thanks to low solvent consumption, reduced execution time and good recovery values.

MEPS, DLLME, UA-DLLME were used for the extraction of 8 BDZ (chlordiazepoxide, oxazepam, lorazepam, bromazepam, flurazepam, flunitrazepam, clobazam, and clonazepam) in three commercial beverages (tonic water, Spritz and red fruit juice). MEPS extraction was optimized testing various elution mixtures of solvents to yield the maximum recovery percentage.

Several parameters influencing DLLME, such as type and dispersive solvent volumes, type and extraction solvent volumes, and ionic strengths were investigated and optimized to yield the highest recoveries.

Capillary HPLC separation with UV-detection was the analytical technique of choice because of its simplicity, robustness and wide diffusion. The method was validated in terms of linearity, precision, accuracy and recovery, LOD, and LOQ. The detailed description of the method, its quantitative performance and a comparison with the MEPS results are presented. Good linearity was obtained both with DLLME and MEPS with correlation coefficients (R^2) spanning from 0.9955 to 1.0000. The limits of detection (LODs) of all analytes ranged from 0.86 ng/ μ L to 1.75 ng/ μ L. The recoveries in spiked beverages spanned from 27.49% to 101.38% for DLLME/UA-DLLME and from 62.29 % to 98.62 % for MEPS in all matrices spiked at the concentration of 20 ng/ μ L.

DRUG FACILITATED CRIMES

I Drug Facilitated Crimes (DFCs) sono azioni criminali in cui la vittima viene resa incapace di reagire ad un'aggressione con l'uso di sostanze inibitrici del sistema nervoso centrale. Questi composti possono essere sia stupefacenti che farmaci usati in dosi (ed ambiti) non propriamente terapeutiche. L'assunzione della sostanza avviene in maniera del tutto inconscia andando a manipolare alimenti e, molto più spesso, bevande che la vittima consumerà (169).

Al di là dei modi che sono gli stessi, i DFCs possono avere diversi obbiettivi: furto, vendetta, estorsione, violenza e stupro sono i principali moventi. In particolare, i Drug Facilitated Sexual Assault (DFSA) sono tra i DFC più comuni nel mondo occidentale. L'incidenza dei DFSA è in forte aumento a partire dalla metà degli anni 90 anche se le prime citazioni di questi crimini risalgono al 1938 con il film *Pygmalion*. Nel 2001 il British Crime Survey riporta che il 5% delle vittime di violenza sessuale è stata drogata in qualche modo ed il 15% riporta di non esser stata in grado di reagire (170). Crimini di questo tipo avvengono spesso in locali pubblici nei quali il criminale manipola una bevanda che in qualche modo farà consumare alla vittima; il drink viene scelto tra quelli alcolici e più complessi, in modo da enfatizzare l'effetto della sostanza e di mascherarne la presenza.

Tra i farmaci con effetti di inibizione del sistema nervoso centrale, emblematica è la vicenda del flunitrazepam; si tratta di una delle benzodiazepine dall'effetto più intenso, usata per sedare i pazienti in cura per abuso di cocaina ed anfetamina. Il flunitrazepam ha però un effetto così intenso che negli anni venne usato come una vera e propria droga, in grado di dare forte dipendenza ed effetti collaterali irreversibili sulle funzionalità cognitive. Un impiego frequente veniva fatto anche nei DFSA proprio grazie all'intensità dei suoi effetti; per i suddetti motivi il Rohypnol, farmaco di cui il flunitrazepam è principio attivo, è stato vietato alla commercializzazione dal governo degli Stati Uniti d'America. In Europa invece uso e commercio sono legali, ed il flunitrazepam viene usato come qualsiasi altra benzodiazepina.

Dal punto di vista forense l'unico reperto rinvenibile (non sempre) nella scena del crimine è un residuo nel fondo del bicchiere; per questo motivo è fondamentale un protocollo efficiente con quantità di campione inferiore al mL. La procedura deve essere in grado di dare risultati affidabili indipendentemente dalla composizione della matrice. Per questi motivi le tecniche micro-estrattive di tipo green si sposano perfettamente con questi requisiti (171).

BENZODIAZEPINE COME ARMA DEL CRIMINE

Le benzodiazepine sono il farmaco più prodotto, consumato e più abusato al mondo; l'EMECDDA (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) dichiara che nel 2006 la produzione legale nel mondo è stata di 180 tonnellate, ripartite tra Italia (32%), India (19%), Cina (16%), Germania (10%) e altri (23%) (172). Principalmente le benzodiazepine vengono prescritte per il trattamento di ansia, tachicardia, insonnia, spasmi, agitazione e convulsione. L'azione a livello biochimico prevede l'aumento dell'effetto GABA (*gamma aminobutyric acid*), ovvero del neurotrasmettitore che ha proprietà sedative, anestetiche e miorilassanti. Proprio grazie all'ampio spettro di patologie trattabili ed alla limitata incidenza di effetti collaterali, le benzodiazepine sono facilmente prescritte dai medici di tutto il mondo, non senza eccessi. L'INCB (International Narcotics Control Board) riporta in Europa un consumo di 37 dosi ogni 1000 abitanti nel triennio 2001 – 2003, 46 dosi per il triennio 2004 – 2006 e 42 dal 2007 al 2009, numeri mai visti per nessun altro farmaco (173). Tra gli studenti di scuola di età compresa tra 15 e 16 anni, la prevalenza dell'uso di "tranquillanti o sedativi senza prescrizione medica" variava dal 2% al 15% nei 24 Stati membri dell'UE e in Norvegia nel 2011, con sei paesi che dichiarano livelli di prevalenza di oltre il 10% (indagini ESPAD) (174).

Le benzodiazepine sono somministrate principalmente per trattamenti nel medio – breve periodo ma, impiegate in quantità ben più massicce rispetto alla dose terapeutica provocano torpore, apnea a perdita di conoscenza. Per questo motivo, insieme a ketamina e GHB sono certamente i composti più frequentemente rinvenuti nei reperti da DFC.

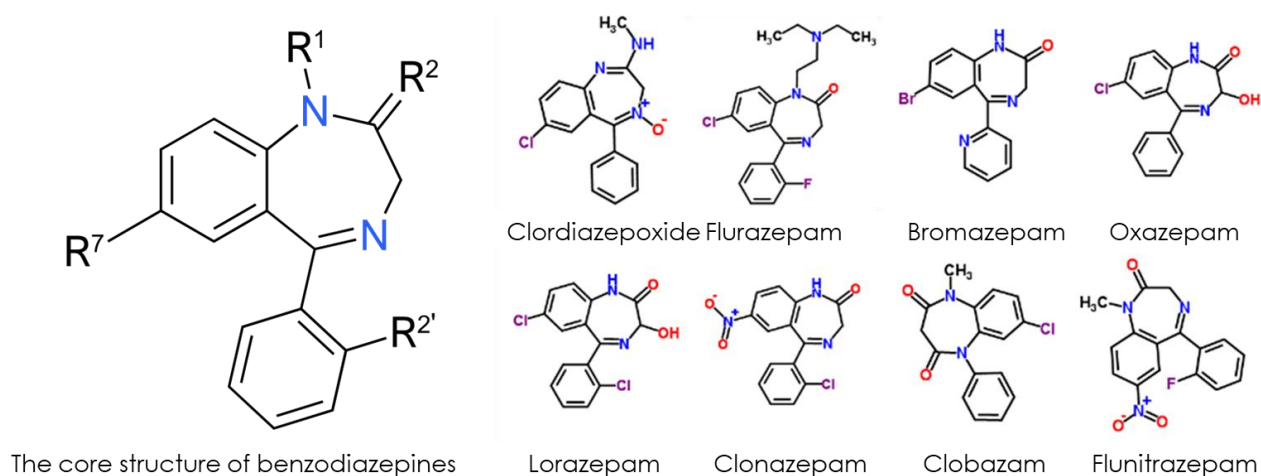


Figura 78. Struttura generale delle benzodiazepine (sinistra) e formule scheletriche delle otto oggetto dello studio.

Le otto benzodiazepine oggetto di questa ricerca sono state chlordiazepoxide, flurazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam e flunitrazepam (Figura 78). Al di là delle differenze strutturali il meccanismo di funzionamento è sempre lo stesso; la differenza maggiore è l'emivita plasmatica, ovvero il tempo necessario per ridurre al 50% la biodisponibilità del farmaco nel plasma, e l'affinità recettoriale.

Le benzodiazepine sono molecole ricche di legami covalenti polari con eteroatomi, ma senza o con pochi gruppi funzionali idrofili; ne consegue una ridotta polarità che rende questi composti liposolubili e scarsamente affini all'acqua. Per aumentarne la biodisponibilità e godere degli effetti collaterali necessari per condurre il crimine, i malviventi sono soliti abbinarle a bevande alcoliche. L'affinità per l'acqua o le matrici organiche è riassunta dal coefficiente di ripartizione ottanolo – acqua P_{ow} : questo parametro, solitamente espresso come logaritmo su base 10 ($\log P_{ow}$), è fondamentale per comprendere se e con che efficienza è possibile estrarre questi composti dalle bevande usando solventi organici. I valori per le otto molecole studiate sono riportati in Tabella 7.

COMPOUND	$\log P_{ow}$
Chlordiazepoxide	2.16
Flurazepam	3.99
Bromazepam	1.65
Oxazepam	2.31
Lorazepam	2.47
Clobazam	1.69
Clonazepam	2.34
Flunitrazepam	1.44

Tabella 7. Valori logaritmici del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua per le otto benzodiazepine studiate.

Le benzodiazepine sono molecole liposolubili e questo fatto facilita la loro estrazione dalla matrice acquosa al solvente organico; ciononostante, la presenza di alcol etilico in quantità considerevoli tipica dei drink, eventuali interazioni con le molecole acido – basiche della matrice ed un'insufficiente forza ionica possono inficiare l'efficienza dell'estrazione.

SVILUPPO DEL PROTOCOLLO DLLME E DELLA CROMATOGRAFIA

Il protocollo DLLME è stato sviluppato cominciando dalla parte finale, ovvero la separazione cromatografica. Nell'ottica di mettere a punto un metodo fruibile anche in ambito routinario, si è preferito individuare un sistema cromatografico economico e diffuso nella maggior parte dei laboratori ma che riuscisse anche ad operare con flussi inferiori a quelli degli HPLC convenzionali, in accordo con le regole della GAC. Il compromesso è stato individuato in un sistema HPLC Agilent 1100 series capillare a fase inversa ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$) dotato di colonna Zorbax Eclipse C18 $3.5\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m} \times 150\ \text{mm}$ e detector UV-Vis Thermo Scientific Dionex 3400 VWD con cella da 45 nL. Questa strumentazione è caratterizzata da un'elevata affidabilità e da buone prestazioni con flussi compresi tra 1 e $10\ \mu\text{L}/\text{min}$, sufficientemente bassi per essere rispettosi dei principi della GAC. Il detector UV-Vis è perfetto per molecole coniugate come assorbono le lunghezze d'onda ultraviolette come gli anelli diazepinici.

La messa a punto della cromatografia è stato uno step piuttosto critico in quanto le otto benzodiazepine scelte sono tutte piuttosto simili tra loro e quindi il loro comportamento cromatografico differisce minimamente solo a causa dei gruppi funzionali. Utilizzare un detector non specifico ed una colonna generica con fase C18 e particelle piuttosto grandi enfatizza l'economicità e la robustezza ma non aiuta nel discriminare molecole così simili tra loro. Vari gradienti multistep, sia di composizione che di portata, sono stati provati nella separazione di una miscela standard $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ma nessuno è riuscito a separare tutti gli analiti. La soluzione è stata trovata nell'uso di acido formico (HCOOH) allo 0.1% m/V in entrambi i solventi della fase mobile; in questo modo, alcune molecole con siti basici vengono protonate ed il tempo di ritenzione cambia drasticamente (grazie alla presenza della carica lo ione viene eluito a percentuale di acqua maggiore).

La metodica sviluppata ha l'obiettivo di essere performante nei residui di tre bevande di utilizzo comune ma dalle caratteristiche piuttosto diverse tra loro, in modo da rappresentare gran parte delle categorie di drink serviti nei locali. Le bevande studiate sono state acqua tonica (matrice contenente CO_2 e un'elevata concentrazione zuccherina), succo di frutti rossi (matrice particolarmente complessa, ricca di composti organici in grado di interferire con la rivelazione UV e di particolato solido) e un aperitivo alcolico (matrice con interferenti UV ed anche una concentrazione di alcool superiore al 10% v/v). I campioni sono stati preparati andando a diluire le

benzodiazepine nelle bevande a tre diverse concentrazioni (10, 20 e 100 ng/μL) rappresentative di valori caratteristici in casi reali.

Il metodo è stato sviluppato da zero partendo da basi di letteratura studiando principalmente i parametri chiave come concentrazione di sale, tipo e quantità di solvente estrattore e tipo e quantità di solvente dispersivo. Dalla combinazione delle migliori condizioni (frutto di compromesso in quanto non per tutte le molecole studiate la miglior efficienza viene ottenuta col metodo proposto) è stato individuato un protocollo in grado di dare buoni recuperi in particolare per i campioni a 10 ng/μL e 20 ng/μL (superiori al 80%) mentre in quello a 100 ng/μL il risultato è sensibilmente inferiore (per alcuni analiti prossimo al 50%); questo andamento, comune peraltro alle tre bevande estratte, è stato attribuito ad un insufficiente trasferimento di materia dalla fase acquosa alla fase organica. Per sopperire a questo limite il metodo è stato rivisitato andando a sostituire l'agitazione meccanica - manuale con l'impiego di ultrasuoni; il protocollo diventa così di tipo Ultrasound Assisted Dispersive Liquid – Liquid Micro Extraction (UA - DLLME). I recuperi ottenuti sono sensibilmente migliori in tutte le matrici (fino a 25% di recupero in più) soprattutto per i campioni a 100 ng/μL, a conferma dell'ipotesi proposta. Il metodo così sviluppato risulta lineare tra 2.5 e 250 ng/μL per tutte le benzodiazepine con una RSD% nei 5 giorni compresa tra 0.70 e 5.82%.

Le prestazioni del metodo DLLME sono state paragonate al protocollo MEPS sviluppato e proposto da Magrini et. al. dedicato all'estrazione di benzodiazepine da superalcolici. Il metodo è stato leggermente adattato alle matrici oggetto di studio provvedendo a de-gasare l'aperitivo e centrifugare il succo di frutti rossi. Le prestazioni del metodo MEPS sono risultate migliori sui campioni più concentrati ma inferiori per le due concentrazioni più contenute dove probabilmente l'incidenza del carry-over ha maggior incidenza in termini relativi.

Tutti i dettagli dello sviluppo e delle prestazioni del metodo sono stati pubblicati su Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis in un articolo intitolato *“Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection”*. Per completezza, il testo dell'articolo è riportato nelle prossime pagine.



Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection

Maurizio Piergiovanni, Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Veronica Termopoli, Pierangela Palma*

University of Urbino Carlo Bo, Department of Pure and Applied Sciences, LC-MS Laboratory Piazza Rinascimento 6, 61029 Urbino, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2018
Received in revised form 14 March 2018
Accepted 15 March 2018
Available online 17 March 2018

Keywords:

Benzodiazepine
Green analytical chemistry
Sample preparation
UV detection
MEPS
DLLME

ABSTRACT

Dispersive liquid-liquid microextraction with and without ultrasound assistance (DLLME, UA-DLLME) and microextraction with packed sorbent (MEPS) methods for the extraction and determination of eight different benzodiazepines (BDZ) (chlordiazepoxide, flurazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam, and flunitrazepam) in three commercial non-alcoholic and light alcoholic beverages were optimized and compared. Benzodiazepines are frequently used for their extensive diffusion and strong numbing effect in drug-facilitated crimes (DFC). The tiny small amount of sample required for DLLME and MEPS extraction makes them very suitable for specimens collected at the crime scene of DFCs. Microextraction techniques are of increasing interest thanks to their accordance to green analytical chemistry (GAC) guidelines providing good recovery values. Ultrasound assistance (UA-DLLME) was used to investigate whether this type of energy can improve the recoveries of the analytes. Analyses of the extracts were performed with reverse-phase capillary high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC – UV), thanks to low environmental impact, robustness, diffusion, and affordability. Recovery percentages at three different concentrations in the three beverages were between 14.30% and 103.28% with intraday and interday RSD lower than $\pm 2.78\%$. The same samples were extracted using a MEPS protocol, and the results were compared with those obtained with DLLME. MEPS gave recoveries between 20.90% and 101.88% for all matrices showing a better performance than DLLME at higher concentrations, though lower recoveries were observed with diluted samples.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Green chemistry principles are of increasing importance to reduce the environmental impact of chemical processes [1]. The concept of green chemistry was presented by Paul Anastas based on the idea of sustainable development. At first, the attention was focused on industrial-scale processes, such as pharmaceuti-

cal industry, because of diffusion and high environmental impact. Anastas and Warner based the green chemistry approach on 12 principles tailored to reduce the environmental impact of synthetic chemistry [2]. Only some of them can be applied to analytical chemistry, whereas other aspects are missing. In the following years, every discipline of chemistry was reviewed in accordance with green chemistry guidelines, including analytical chemistry [3]. The name “green analytical chemistry” (GAC) appeared for the first time in 2000 in laboratory guidelines [4]. Galuška et al. [5] formulated the 12 principles of GAC that should be considered to combine performance and environmental sustainability before developing new methods. Several extraction methods in accordance with GAC principles have been developed in the recent years [6]. Sample preparation and extraction steps can impact the environment very hard, due to high solvent consumption [5]. Proper green organic solvents should be selected using the solvent selection guide (SSG), preferring environmental-friendly ones, such as those derived from natural and/or renewable resources [7,8]. Solvents and sample volumes, pre-treatments, and waste should be minimized, as well as

Abbreviations: ACN, acetonitrile; BDZ, benzodiazepine; DFC, drug-facilitated crime; DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction; ECD, electron capture detector; GAC, green analytical chemistry; GC, gas chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; LLE, liquid-liquid extraction; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MeOH, methanol; MEPS, microextraction by packed sorbent; N, number of theoretical plates; NPD, nitrogen-phosphorous detector; QuEChERS, Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction; S/N, signal-to-noise; UA-DLLME, ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction; UV, ultraviolet detection.

* Corresponding author.

E-mail address: pierangela.palma@uniurb.it (P. Palma).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.030>

0731-7085/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

the amount of energy involved, such as heat, microwave ultrasound assistance, and others.

Methods that use microliter-scale volumes (or lower) of extracting phase are called microextraction analytical procedures. Solid-phase microextraction (SPME) [9] was the first successful attempt to scale down the classical solid-phase extraction (SPE), opening the way to many other microextraction concepts [8]. All microextraction techniques, regardless the different operative principles, share the idea of scaling down the amount of sample and reagents involved and favor the sustainability of the method concerning GAC.

One of the most studied microextraction techniques in the last 10 years is the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). This method was presented by Assadi et al. in 2006 and was developed at first for the extraction of organic compounds in water [10,11]. Thanks to its flexibility and versatility, various protocols were designed to optimize the performance of many applications [12]. DLLME is a ternary system composed of:

- 1) Aqueous sample
- 2) Extracting solvent that must not be miscible with water [13]
- 3) Dispersive solvent that must be miscible both with water and extracting solvent [14,15].

Salt (usually NaCl) can be added as a modifier when needed, to boost the recovery of the analytes, thanks to the “salting out effect” [16,17]. The extraction exploits on the distribution equilibrium of the analytes between aqueous-phase and extracting organic phase [18]. When dispersive and extracting solvents are mixed and introduced in the aqueous phase, a cloudy solution of droplets of extracting solvent is formed. A vast contact area is created between the two phases, promoting a fast mass transfer [19]. Typically, this dispersion is obtained by mechanical agitation, but better recoveries of the analytes were achieved using ultrasound assistance (UA); hence the term ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction (UA-DLLME) [20]. DLLME meets GAC rules because sample pre-treatment is limited, it works with small sample size (less than 1 mL), solvents, and energy, consequently waste production is minimized. Operator's safety is also highly increased, thanks to the reduction of quantities, and use of hazardous solvents, if necessary, is limited to the extracting one. Moreover, the method is simple because it does not need sophisticated instrumentation, flexible, and provides high enrichment factors and recoveries [21]. Limitations regard absence of automatization, selectivity, polarity of the extractable analytes, and extracting solvents [22]. DLLME has been widely used in forensic applications where the specimens collected at the crime scene are quite small [23]. Drug-facilitated crimes (DFC) include rapes, robberies, and general violence committed on a victim who is under the effect of a psychoactive drug dissolved into a beverage or hidden in food [24,25]. DFCs were first mentioned in the 1938 movie *Pygmalion*, and their incidence is continually increasing. In the UK, the number of victims between 1995 and 2005 increased by 256% [26]. The most frequently detected substances are zopiclone, zolpidem, anesthetics, gamma-hydroxybutyrate (GHB), cannabinoids, ketamine, amphetamine-type stimulants, and sedatives such as benzodiazepines [27]. Benzodiazepines are drugs that act as a central nervous system depressant, used as a minor tranquilizer, effective as anxiolytics, hypnotics, and anticonvulsants. They have replaced mainly barbiturates in mild anxiety treatment thanks to the notable lower risk of overdose, and lack of an antidote for barbiturate overdose. BDZs can be easily found in the pharmaceutical market and are readily available for crimes intent [28]. The extraction of BDZs in DFCs sample is usually done by MEPS [29,30], QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) [31], and Solid-phase microextraction (SPME) [32–34] due of their

excellent efficiency with restrained samples combined with good concentration potential. Microextraction by packed sorbent (MEPS) is another example of green sample extraction method presented in 2004 [35–40]. It can be considered as miniaturization of solid-phase extraction (SPE) with the difference that the solution flow can go two directions: up to down and vice-versa. A typical MEPS device is similar to a syringe, with a cartridge containing a small amount of sorbent (approximately 2 mg) placed between the barrel and the needle. It can be semi or fully automated, online to various instruments or offline. MEPS has been used in different matrices such as biological fluids, environmental, food proving its validity as green analytical technique, thanks to reduced solvent consumption and waste generation, small sample volume needed, economy, ease-of-use.

Several DLLME protocols for the extraction of BDZs were developed for biological matrices like human urine [41,42], plasma [43] and whole blood [44] but none for beverage residues where the analyte is not metabolized. BDZ were also determined with GC–MS, GC–NPD and GC-micro-ECD using liquid-liquid extraction (LLE) and QuEChERS [45,26]45 and references therein,26].

In this paper, a DLLME protocol was optimized for the extraction of eight BDZs (chlordiazepoxide, flurazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam, and flunitrazepam) in three different beverages. The selected BDZs are commonly utilized in DFCs, and none of them is a metabolite of the others. Different solvent types and volumes, salt concentration, and ultrasound assistance were considered. The GAC approach was also extended to the chromatographic step using a capillary HPLC–UV instrument working in multistep gradient elution to match chromatographic efficiency, low solvent consumption, and time of analysis. The method was validated regarding linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), intra-day and inter-day repeatability. The results were compared to those obtained with the same samples using UA-DLLME and a MEPS protocol developed by L. Magrini et al. [29].

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Pure powder standards of chlordiazepoxide, flurazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam, and flunitrazepam were a kind gift of the University Hospital of Ancona, Italy. The standard of anthracene (internal standard) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). All HPLC and GC grade solvents were purchased from VWR international (Milan, Italy). Formic acid (purity grade $\geq 98\%$) was acquired from PAN-REAC QUIMICA SA (Barcelona, Spain). eVol[®] XR MEPS device (SGE Analytical Science) and C18 needles were purchased from Lab-Service Analytica s.r.l. (Bologna, Italy). The tested beverages were tonic water, red-fruit juice, and a commercial pre-mixed spritz purchased at a local supermarket. Tonic water and red-fruit juice are non-alcoholic drinks, spritz is a light cocktail (11% v/v alcohol), and they were chosen because trendy, and particularly appreciated by women. These three matrices are very different, in fact, red-fruit juice is a complex matrix and requires a pre-treatment, tonic water and spritz are simpler matrices and were simply degassed. NaCl powder (purity $>99.5\%$) was purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

2.2. Stock and working solutions

All the nine stock standard solutions (eight BDZ and anthracene) were prepared from powders in MeOH at a concentration of 10.000 ng/ μ L for anthracene, and 5.000 ng/ μ L for all BDZs. BDZs

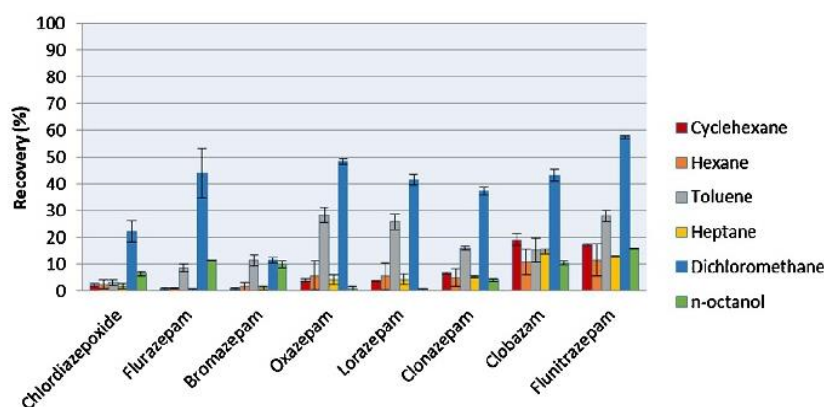


Fig. 1. Tests on different extracting solvents using ACN as dispersive solvent.

stock solutions were mixed to obtain stock mixtures at a concentration of 500 ng/ μ L for all BDZs, except chlordiazepoxide (250 ng/ μ L) to balance the different UV response. Working solutions of standards for calibration curves were prepared from stock mixtures at the concentrations of 5; 10; 50; 100, and 250 ng/ μ L (2.5; 5.0; 12.5; 25; 50, and 125 ng/ μ L for chlordiazepoxide) by dilution in volumetric flasks using 90% acetonitrile: 10% water (v/v) both acidified with 0.1% formic acid. Working solutions in DLLME and MEPS extracts of the three matrices were prepared at the same concentrations. An internal standard was added to all solutions to a final concentration of 500 ng/ μ L. Anthracene was selected as the internal standard because of stability, good absorbance at the selected UV wavelength (254 nm), and retention time. Calibration curves were calculated for standard solutions and matrices using DLLME and MEPS methods.

To simulate samples collected at a crime scene of a DFC regarding matrix, drug and concentrations sets of "equivalent-to-real sample" were prepared [46]. The three beverages were fortified at the concentrations of 10; 20, and 100 ng/ μ L (5; 10, and 50 ng/ μ L for chlordiazepoxide) to test the recovery performance. These samples were labeled E10, E20, and E100, respectively. This concentration range was chosen because it is sufficient to induce the desired hypnotic effect and equivalent to those found in DFCs. Each sample was extracted in triplicate.

2.3. Preliminary steps

Beverages, fortified samples, and stock solutions were prepared in amber vials and stored refrigerated at 4°C. Red-fruits juice was centrifuged at 6000 rpm for 5 min to separate the solid-phase from the liquid matrix. This step was needed to avoid the syringe clogging during MEPS extraction and particulate precipitation during DLLME extraction. Tonic water and spritz were only degassed before MEPS extraction to eliminate CO₂. No preliminary treatment was needed for tonic water and spritz before DLLME and UA-DLLME.

2.4. Development of the DLLME procedure

No DLLME methods were reported in the literature for the extraction of BDZs in the selected matrices; therefore, a new protocol was developed. At first, a qualitative approach was used to find the most efficient dispersive and extracting solvents. Several tests were performed on the red-fruit juice, as the most complex matrix, with different extracting and dispersive solvents starting from 100 μ L of extracting, 200 μ L of dispersive and 25 mg of NaCl [9]. Considering the characteristics required for the ideal extracting solvent (low boiling point; different density than water; high

extraction capability of analytes), dichloromethane, hexane, cyclohexane, heptane, toluene, and *n*-octanol were selected and paired with acetonitrile as dispersive solvent. The highest recoveries for each BDZ were obtained with dichloromethane, whereas the other extracting solvents gave unsatisfying results (Fig. 1). This behavior was in accordance with the polarity of dichloromethane, which is the most polar among the investigated solvents.

The same qualitative evaluation was also performed to select the appropriate dispersive solvent. Acetonitrile (ACN), acetone, tetrahydrofuran, and 2-propanol were paired with dichloromethane giving similar recoveries with a slight advantage of ACN for most BDZs (Fig. 2). Therefore, ACN was chosen as the dispersive solvent.

The quantitative approach regarded the amount of NaCl and the volume of the selected solvents.

The presence of NaCl is fundamental because the "salting out effect" can boost the extraction efficiency. The specific concentration to obtain the maximum performance was also investigated. Solutions of NaCl at 0; 25; 50; 100; 150; 200, and 250 mg/mL were tested, working at the conditions reported above. The best concentration was found at 250 mg/mL, close to the saturation value (Fig. 3).

The ideal volumes of extracting and dispersive solvents were also evaluated as 100; 200; 300, and 400 μ L. Different volumes of solvents were tested to achieve the highest recovery for every BDZ, due to the different polarities and affinity of every pair of extracting-dispersive solvent. These values were 200 μ L for dichloromethane (Fig. 4) and 300 μ L for ACN (Fig. 5).

2.5. DLLME and UA-DLLME extractions

1 mL of sample and 250 mg of NaCl were introduced into a screw-capped test tube and mixed until homogeneous, then 200 μ L of dichloromethane (extracting solvent) and 300 μ L of acetonitrile (dispersive solvent) were added to the solution to create a two-phase system. The mixture was rapidly aspirated and ejected 30 times with a glass Pasteur pipette to form a cloudy dispersion of organic phase droplets in the aqueous bulk. In UA-DLLME extraction, the sample was placed in an ultrasound bath at room temperature for 1 min. The sample was centrifuged at 5500 rpm for 5 min to separate the organic phase that was collected into a 1.5 mL vial. The extract was dried using a nitrogen stream at room temperature, and then re-dissolved in 100 μ L of 90:10 (v/v) ACN:H₂O acidified with 0.1% formic acid to improve the chromatographic separation and concentrate 10:1 the extracted analytes.

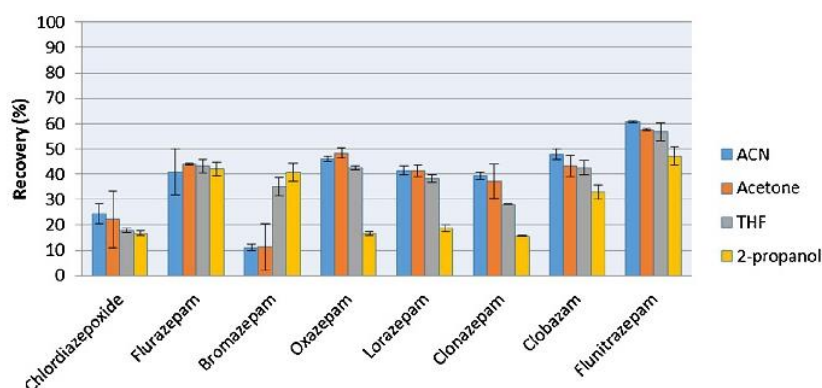


Fig. 2. Tests on different dispersive solvents using dichloromethane as extracting solvent.

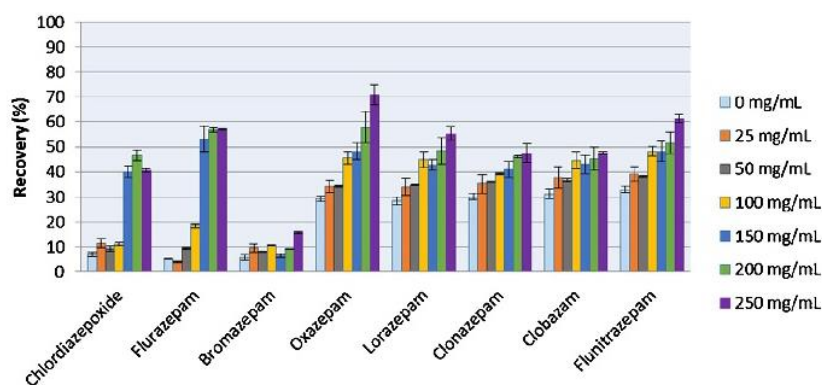


Fig. 3. Evaluation of the optimal concentration of NaCl to promote the salting-out effect. ACN and dichloromethane were used respectively as dispersive and extracting solvents.

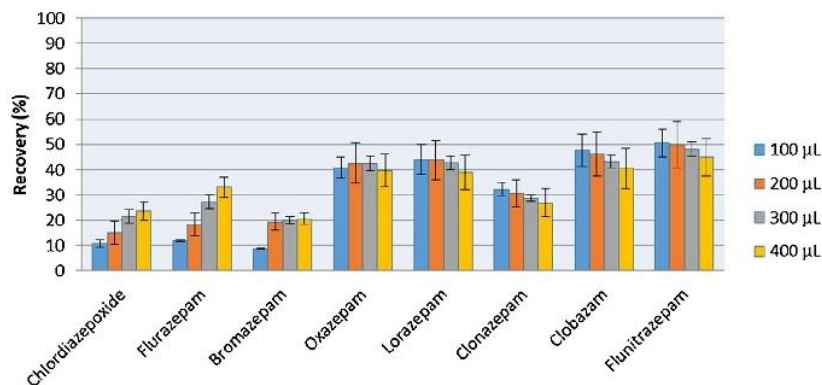


Fig. 4. Evaluation of the optimal volume of extracting solvent (dichloromethane).

2.6. MEPS procedure and extraction

MEPS device consisted of a 100 µL syringe equipped with a C18 cartridge, and the extraction was performed in off-line mode. Following the manufacturer's guidelines, each cartridge was used 50 times and then replaced. Every step consisted in a cycle of aspiration-dispensation through all the syringe volume. The extraction was done manually at room temperature, as follows:

- 1) Conditioning: three cycles with ACN (100 µL) followed by three cycles with H₂O (100 µL)

- 2) Drying: twenty cycles of air aspiration
- 3) Extraction: three cycles with 100 µL of equivalent-to-real sample
- 4) Drying: see point 2
- 5) Elution: three cycles with 100 µL of extracting mixture (90:10 (v/v) ACN:H₂O + 0.1% formic acid)
- 6) Washing: three cycles with 100 µL of 2-propanol

The solution obtained at point 5 was ready for injection and determination. The working flow rate was set at 10 µL/s for drying steps, and 1 µL/s for the others.

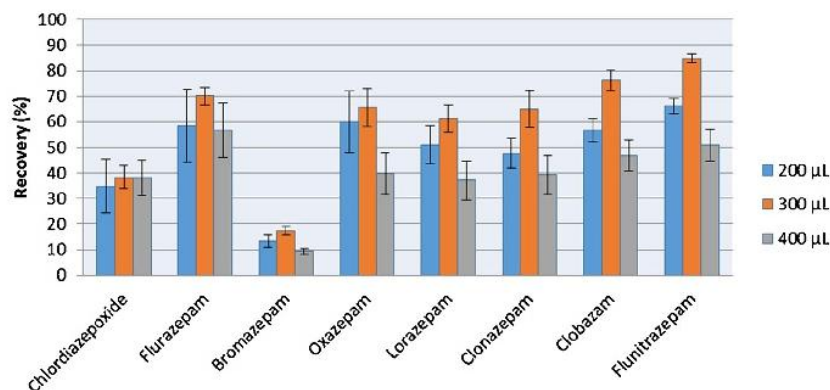


Fig. 5. Evaluation of the optimal volume of dispersive solvent (ACN).

Table 1
Method validation data.

DLLME ¹ /UA-DLLME ¹ MEPS ²	Equation	R ²	Range of linearity (ng/µL)	LOD (ng/µL)	LOQ (ng/µL)
Tonic water					
Chlordiazepoxide	¹ y = 0.0169x + 0.0164 ² y = 0.0206x + 0.0185	¹ 0.9955 ² 0.9980	¹ 2.50–125.00 ² 2.50–125.00	¹ 1.52 ² 1.33	¹ 2.53 ² 2.22
Flurazepam	¹ y = 0.0065x – 0.0880 ² y = 0.0055x + 0.0055	¹ 0.9993 ² 0.9996	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.65 ² 1.65	¹ 5.51 ² 5.49
Bromazepam	¹ y = 0.0088x – 0.0382 ² y = 0.0042x + 0.0146	¹ 0.9997 ² 0.9988	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.44 ² 1.11	¹ 4.80 ² 3.69
Oxazepam	¹ y = 0.0097x – 0.0001 ² y = 0.0094x + 0.0155	¹ 0.9987 ² 0.9990	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.33 ² 1.43	¹ 4.42 ² 4.77
Lorazepam	¹ y = 0.0062x – 0.0170 ² y = 0.0054x + 0.0017	¹ 0.9989 ² 0.9998	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.51 ² 1.53	¹ 5.05 ² 5.10
Clonazepam	¹ y = 0.0075x – 0.0370 ² y = 0.0055x + 0.0025	¹ 0.9992 ² 0.9998	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.75 ² 1.55	¹ 5.83 ² 5.16
Clobazam	¹ y = 0.0083x – 0.0332 ² y = 0.0046x + 0.0009	¹ 0.9987 ² 0.9997	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.45 ² 1.58	¹ 4.85 ² 5.27
Flunitrazepam	¹ y = 0.0064x – 0.0268 ² y = 0.0037x + 0.0100	¹ 0.9983 ² 0.9992	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.63 ² 1.51	¹ 5.42 ² 5.03
Spritz					
Chlordiazepoxide	¹ y = 0.0151x + 0.0989 ² y = 0.0136x + 0.0011	¹ 0.9982 ² 0.9995	¹ 2.50–125.00 ² 2.50–125.00	¹ 0.92 ² 1.05	¹ 2.18 ² 2.25
Flurazepam	¹ y = 0.006x + 0.0117 ² y = 0.0055x + 0.0027	¹ 0.9995 ² 0.9999	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.20 ² 1.59	¹ 4.01 ² 5.29
Bromazepam	¹ y = 0.0083x – 0.0014 ² y = 0.0062x + 0.0013	¹ 0.9992 ² 0.9998	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.31 ² 1.56	¹ 4.36 ² 5.19
Oxazepam	¹ y = 0.0081x – 0.0091 ² y = 0.0045x + 0.0050	¹ 1.0000 ² 0.9990	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.27 ² 1.63	¹ 4.23 ² 5.43
Lorazepam	¹ y = 0.0046x – 0.0125 ² y = 0.0028x + 0.0050	¹ 0.9999 ² 0.9994	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.09 ² 1.27	¹ 3.63 ² 4.23
Clonazepam	¹ y = 0.005x – 0.0077 ² y = 0.0035x + 0.0049	¹ 0.9997 ² 0.9997	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.37 ² 1.19	¹ 4.56 ² 3.98
Clobazam	¹ y = 0.0052x – 0.0109 ² y = 0.0039x + 0.0108	¹ 0.9999 ² 0.9992	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.26 ² 1.66	¹ 4.21 ² 5.53
Flunitrazepam	¹ y = 0.0044x + 0.0129 ² y = 0.0041x + 0.0103	¹ 0.9992 ² 0.9992	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.57 ² 1.40	¹ 5.25 ² 4.68
Red fruit juice					
Chlordiazepoxide	¹ y = 0.0167x + 0.1007 ² y = 0.0159x – 0.0167	¹ 0.9984 ² 0.9993	¹ 2.50–125.00 ² 2.50–125.00	¹ 1.08 ² 1.24	¹ 2.47 ² 2.07
Flurazepam	¹ y = 0.0063x + 0.0191 ² y = 0.0049x + 0.0121	¹ 0.9955 ² 0.9993	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.34 ² 1.56	¹ 4.48 ² 5.18
Bromazepam	¹ y = 0.0081x + 0.0206 ² y = 0.0024x + 0.0082	¹ 0.9983 ² 0.9992	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.38 ² 1.28	¹ 4.61 ² 4.28
Oxazepam	¹ y = 0.0089x + 0.0003 ² y = 0.0075x + 0.0381	¹ 0.9989 ² 0.9964	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.19 ² 1.52	¹ 3.96 ² 5.07
Lorazepam	¹ y = 0.0058x + 0.0090 ² y = 0.0046x + 0.0135	¹ 0.9995 ² 0.9984	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 0.86 ² 1.36	¹ 2.88 ² 4.52
Clonazepam	¹ y = 0.0067x + 0.0050 ² y = 0.0048x + 0.0155	¹ 0.9992 ² 0.9983	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.03 ² 1.58	¹ 3.45 ² 5.26
Clobazam	¹ y = 0.0077x + 0.0108 ² y = 0.0041x + 0.0103	¹ 0.9995 ² 0.9992	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 0.93 ² 1.29	¹ 3.09 ² 4.30
Flunitrazepam	¹ y = 0.0058x + 0.0045 ² y = 0.0032x + 0.0203	¹ 0.9998 ² 0.9958	¹ 5.00–250.00 ² 5.00–250.00	¹ 1.51 ² 1.22	¹ 5.04 ² 4.07

Carryover phenomena were addressed rinsing the cartridge after each elution with the solvent used for extraction. The chromatographic plots were blank in all cases, indicating no carryover and complete elution of all analytes.

2.7. Chromatographic analysis

The analyses were performed with an Agilent 1100 series capillary HPLC system (Santa Clara, CA, USA) equipped with a Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Variable Wavelength UV detector, 45 nL flow cell (Waltham, MA, USA), and the capillary column was an Agilent Zorbax Eclipse 3.5 μ m C-18 (300 μ m \times 150 mm) (Santa Clara, CA, USA). The solvents were: water (A) and ACN (B) both acidified with 0.1% formic acid and the elution gradient was the following (t in min): t 0, B = 10%; t 3, B = 42%; t 6, B = 43%; t 7, B = 100%; t 12, B = 100%; t 13, B = 10%. The flow rate was 4 μ L/min, and the injection volume 100 nL. The analyses were carried out at room temperature. The selected working UV wavelength was 254 nm to meet the highest absorbance for all analytes.

3. Results and discussion

3.1. Instrumental and methods validation

The methods were validated in accordance with the ICH guidelines [47], considering retention times, linearity (R^2), LOD, LOQ, intraday and interday precision. Linearity was assessed with five-point calibration curves using the internal standard method, as described in Section 2.2. Each concentration was injected in triplicate, and internal standard calibration curves were plotted using the least-squares regression of nominal concentration versus the analyte/internal standard area ratio. Slope, intercept and Pearson square determination coefficient (R^2) were used for linearity assessment (Table 1). R^2 values were in all cases between 0.9955 and 0.9999 that can be considered satisfactory, given the complexity of the three matrices. LODs were calculated considering a signal-to-noise ratio (S/N) 3:1, whereas for LOQs the signal to noise ratio (S/N) was 10:1. LODs were between 1.11 and 1.75 ng/ μ L with

MEPS and 0.86 and 1.91 ng/ μ L with DLLME/UA-DLLME. LOQs with MEPS were between 2.07 and 5.53 ng/ μ L and between 2.18 and 5.83 with DLLME/UA-DLLME for all BDZs.

Intraday and interday precision were evaluated injecting the most complex matrix, red-fruit juice, using E20 samples extracted with DLLME, UA – DLLME and MEPS. The injections were repeated five times a day for five consecutive days. The results are shown in Table 2 reporting the RSD% of the peak areas/internal standard area ratio. Both DLLME and UA – DLLME tests gave good repeatability with intraday RSD between $\pm 0.14\%$ and $\pm 5.82\%$ and interday RSD between $\pm 0.78\%$ and $\pm 4.21\%$. MEPS showed to be slightly more constant because intraday RSD is comprised between $\pm 0.55\%$ and $\pm 2.27\%$ and interday RSD between $\pm 0.53\%$ and $\pm 2.02\%$. The reproducibility of net retention times (t'r) was very high with all methods, with RSD between $\pm 0.04\%$ and $\pm 0.17\%$.

The number of theoretical plates (N) was calculated on the internal standard peak to monitor column efficiency, in accordance with the ICH-Q2-R1 guidelines [47]. The N daily media spanned between 119600 and 142700 over a period of 68 days, demonstrating that no significant decrease in the column performance was observed.

3.2. Comparison between DLLME, UA-DLLME and MEPS extraction methods

3.2.1. Tonic water

Tonic water is a commercial, alcohol-free, colorless drink. The recovery values of BDZs in tonic water are reported in Table 3. In general, MEPS gave the highest values at all concentrations, except for flurazepam which is the only BDZ with a tertiary amine group in the molecular structure. The recoveries were lower with DLLME, with values half as high. UA-DLLME boosted the extracting performance of the DLLME, increasing the recovery percentage up to 25.15% respect to DLLME. In a few cases, flunitrazepam (E10) and chlordiazepoxide (E100) the recoveries are slightly higher than MEPS, whereas lorazepam (E20) and clonazepam (E20) are comparable. UA enhanced the surface-to-volume ratio of the extracting drops and optimized the liquid-liquid mass transfer. Furthermore, UA possibly promoted the cleavage of the hydrogen-bond interac-

Table 2
Intraday, interday and retention times precision calculated on red fruit juice E20.

COMPOUNDS	Intraday precision (RSD% \pm) n = 5	Interday precision (RSD% \pm) n = 5	t'r (RSD% \pm)	Intraday precision (RSD% \pm) n = 5	Interday precision (RSD% \pm) n = 5	t'r (RSD% \pm)	Intraday precision (RSD% \pm) n = 5	Interday precision (RSD% \pm) n = 5	t'r (RSD% \pm)
	DLLME			UA-DLLME			MEPS		
Chlordiazepoxide	0.78	1.67	0.13	4.03	3.29	0.08	1.41	1.37	0.09
Flurazepam	1.75	1.72	0.14	2.69	2.41	0.09	0.81	0.53	0.07
Bromazepam	0.75	0.78	0.13	0.97	1.02	0.17	1.38	1.30	0.14
Oxazepam	1.46	1.60	0.15	0.88	3.19	0.09	2.16	1.87	0.07
Lorazepam	0.14	0.98	0.14	2.71	2.32	0.08	0.55	0.70	0.09
Clonazepam	3.43	2.18	0.13	5.82	4.21	0.07	1.23	0.97	0.07
Clobazam	2.79	2.78	0.10	1.13	2.82	0.06	0.60	1.30	0.09
Flunitrazepam	0.90	1.39	0.08	2.13	1.72	0.04	2.27	2.02	0.09

Table 3
Recovery percentages in tonic water, RSD \pm in round brackets.

COMPOUND	E10			E20			E100		
	DLLME	UA-DLLME	MEPS	DLLME	UA-DLLME	MEPS	DLLME	UA-DLLME	MEPS
Chlordiazepoxide	45.46 (0.60)	54.33 (0.19)	78.32 (9.50)	57.17 (3.62)	58.84 (0.98)	62.29 (1.41)	35.28 (3.97)	44.32 (1.39)	40.63 (1.97)
Flurazepam	76.07 (1.70)	101.22 (0.98)	97.93 (0.01)	87.73 (2.55)	101.38 (1.72)	94.23 (5.68)	55.44 (3.57)	78.30 (0.19)	60.77 (0.15)
Bromazepam	35.00 (1.52)	58.73 (2.21)	78.02 (0.75)	27.49 (0.98)	51.35 (3.23)	78.90 (11.30)	18.37 (1.69)	37.96 (0.25)	80.06 (4.17)
Oxazepam	61.92 (1.87)	77.92 (0.74)	78.87 (0.25)	68.22 (3.07)	78.25 (1.91)	86.28 (1.47)	40.55 (5.91)	52.48 (0.27)	77.97 (0.50)
Lorazepam	58.91 (1.83)	67.18 (2.29)	92.11 (1.35)	65.61 (3.02)	64.32 (3.35)	96.91 (3.97)	40.85 (5.59)	53.52 (0.35)	89.28 (3.08)
Clonazepam	66.77 (2.57)	72.62 (1.79)	92.60 (0.80)	72.23 (2.40)	71.82 (4.01)	92.62 (3.38)	42.01 (5.94)	53.03 (0.09)	88.95 (2.05)
Clobazam	59.47 (1.55)	82.05 (1.66)	98.10 (0.80)	66.28 (1.57)	74.21 (0.27)	98.26 (2.16)	37.35 (0.99)	44.70 (0.59)	93.03 (1.89)
Flunitrazepam	62.32 (2.06)	77.25 (2.28)	72.76 (0.43)	66.76 (4.89)	74.85 (1.53)	91.94 (2.18)	34.81 (6.22)	48.54 (0.83)	85.21 (0.88)

Table 4Recovery percentages in spritz. RSD \pm % in round brackets.

COMPOUND	E10			E20			E100		
	DLLME	UA-DLLME	MEPS	DLLME	UA-DLLME	MEPS	DLLME	UA-DLLME	MEPS
Chlordiazepoxide	74.80 (0.34)	90.12 (3.13)	99.45 (0.61)	94.78 (4.23)	95.01 (3.37)	82.23 (3.03)	64.41 (4.68)	64.43 (0.95)	68.22 (3.78)
Flurazepam	101.19 (2.28)	101.26 (0.73)	93.16 (0.58)	97.41 (2.51)	98.47 (0.51)	82.25 (0.42)	82.67 (2.40)	85.12 (0.79)	67.36 (1.55)
Bromazepam	50.64 (4.52)	65.79 (1.17)	84.11 (0.28)	37.33 (1.62)	82.93 (0.30)	72.56 (0.53)	42.97 (2.84)	51.50 (0.56)	75.42 (1.36)
Oxazepam	79.68 (11.93)	95.95 (3.75)	96.62 (0.92)	78.48 (4.13)	90.30 (3.98)	99.23 (5.08)	55.54 (2.76)	58.05 (0.35)	99.94 (1.71)
Lorazepam	76.63 (4.07)	88.87 (6.38)	96.02 (2.01)	77.30 (7.87)	83.99 (2.83)	87.05 (2.06)	63.24 (3.47)	63.76 (0.47)	96.13 (4.83)
Clonazepam	88.58 (2.75)	101.68 (2.40)	101.88 (1.43)	91.49 (7.58)	95.98 (3.44)	66.86 (2.93)	70.62 (3.45)	71.40 (0.17)	77.06 (1.27)
Clobazam	100.65 (2.85)	93.65 (4.56)	84.58 (1.98)	103.28 (4.68)	86.87 (3.68)	80.35 (2.15)	77.44 (10.23)	64.20 (0.65)	87.14 (1.69)
Flunitrazepam	76.40 (3.62)	102.84 (2.23)	78.37 (2.34)	89.46 (1.08)	93.94 (0.56)	75.85 (1.85)	60.94 (4.04)	63.00 (0.13)	80.39 (0.19)

Table 5Recovery percentages in red-fruit juice. RSD \pm % in round brackets.

COMPOUND	E10			E20			E100		
	DLLME	UA-DLLME	MEPS	DLLME	UA-DLLME	MEPS	DLLME	UA-DLLME	MEPS
Chlordiazepoxide	42.30 (2.01)	40.06 (5.52)	80.89 (1.22)	38.62 (2.69)	69.23 (2.46)	65.88 (1.35)	14.30 (4.65)	38.85 (0.25)	38.00 (1.86)
Flurazepam	78.51 (6.72)	79.05 (0.60)	55.08 (2.33)	97.16 (1.19)	98.21 (0.24)	87.52 (1.31)	34.95 (0.59)	65.88 (0.35)	52.79 (0.13)
Bromazepam	63.66 (2.60)	48.11 (1.59)	60.58 (0.76)	48.11 (4.47)	49.21 (0.16)	101.30 (1.45)	35.52 (1.06)	51.60 (0.85)	99.41 (2.16)
Oxazepam	91.47 (1.85)	76.21 (2.01)	20.90 (4.99)	70.01 (2.35)	81.71 (3.45)	59.76 (4.16)	25.98 (7.83)	47.12 (0.60)	81.35 (1.58)
Lorazepam	77.45 (4.64)	56.45 (0.86)	44.16 (2.46)	56.86 (0.68)	63.62 (3.98)	99.54 (4.26)	21.76 (4.20)	46.19 (0.87)	95.80 (7.83)
Clonazepam	86.82 (4.49)	64.43 (1.23)	49.45 (3.15)	63.19 (3.47)	72.73 (3.46)	88.27 (1.64)	25.06 (4.95)	52.31 (0.75)	99.03 (0.97)
Clobazam	88.71 (3.54)	93.85 (0.37)	61.00 (2.47)	65.89 (0.86)	72.34 (0.41)	97.89 (0.25)	25.86 (2.43)	43.27 (0.60)	99.39 (0.03)
Flunitrazepam	92.15 (3.52)	66.61 (0.39)	23.59 (6.22)	64.07 (1.72)	73.63 (3.24)	79.72 (4.70)	24.36 (1.11)	51.54 (0.70)	99.17 (4.53)

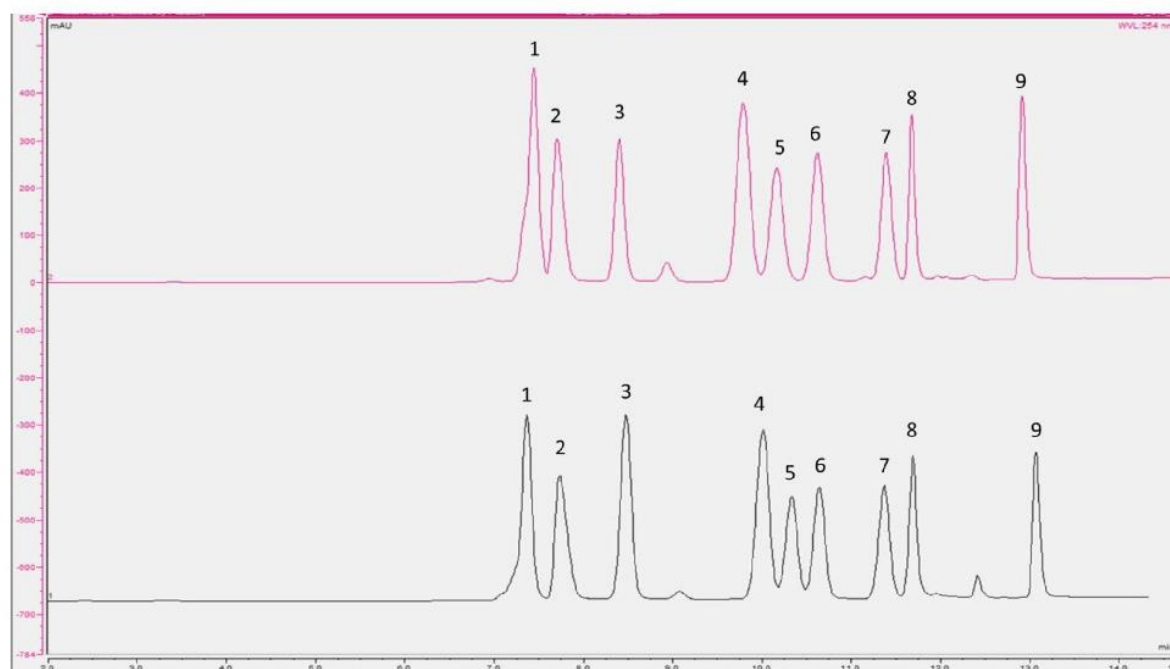


Fig. 6. HPLC-UV chromatograms of (top) 100 ng/μL standard mixture (purple) and (bottom) MEPS E100 red-fruit juice extracted sample (black). 1-chlordiazepoxide; 2-flurazepam; 3-bromazepam; 4-oxazepam; 5-lorazepam; 6-clobazam; 7-clonazepam; 8-flunitrazepam; 9-internal standard (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

tions between BDZs and sugars present in the matrix. Ultrasound assistance is used in applications where hydrogen bond is involved. As an example, Venegas-Sánchez et al. [48] studied the use of ultrasound in hydrogen bond cleavage in polyvinyl alcohol, observing a decrement of the viscosity due to the reduction of OH interactions. UA-DLLME was very efficient in extracting flurazepam from tonic water. In fact, due to the high nucleophilicity of the amine function, UA can stimulate the intermolecular interaction cleavage of flurazepam from matrix compounds.

3.2.2. Spritz

Spritz is a mixture of prosecco wine, sparkling water, and bitter soda, common as aperitif beverage. Typically, it is prepared at the moment, but several industrial products are available on the market. Red colorant and ethanol (11% v/v) are present in the matrix in addition to low sugar content (5 g/100 mL) and CO₂. The recovery percentages are reported in Table 4. As observed with tonic water, MEPS demonstrated to be the extraction technique with the highest recoveries for most BDZs at E100. At E10 and

E20 the recoveries were similar for all the extraction techniques. Also, in this case, the use of UA permitted to improve the extraction of the analytes respect to DLLME, except for clobazam. The behavior of flurazepam was confirmed the same as with tonic water, corroborating the hypothesis regarding possible intermolecular interactions with sugar. Furthermore, due to the presence of ethanol, the matrix is less polar compared to non-alcoholic drinks. Therefore BDZs underwent to lower interactions, such as hydrogen bonds, leading to a noticeable extraction efficiency gain.

3.2.3. Red-fruit juice

Red-fruit juice was the most complex matrix containing sugar (11 g/100 mL), UV–vis interferences, and particulate. Pre-treatment was necessary before extraction to remove suspended material, as described in Section 2.3. Red-fruit juice recovery percentages are reported in Table 5. The extraction efficiency was generally lower than the other matrices with all methods, especially at low concentrations. This behavior can be correlated to the complexity of the matrix. DLLME gave the highest recoveries for most BDZs at E10. In this matrix, the effect of UA could have been detrimental, promoting interactions of the analytes with the matrix, especially at the lowest concentration. At the highest concentrations (E20; E100) MEPS gave the highest recovery values for all BDZs, except flurazepam and oxazepam. Recoveries of flurazepam were in line with those observed in the other two matrices, with the highest values obtained with UA-DLLME at all concentrations.

No significative signals due to interfering compounds were detected in all extracted samples. The small peak at retention time 9.1 min is an interference in the red-fruit juice sample (Fig. 6).

4. Conclusions

Obeying the principles of GAC is of primary importance when proposing new analytical methods. In this work, three green extraction methods were optimized and applied to the analysis of BDZs in commercial alcoholic and non-alcoholic beverages. Capillary HPLC–UV detection completed the green approach proposed.

The results obtained were compared. A new DLLME method was developed for the extraction of the analytes, demonstrating to be compatible with the small amounts of samples commonly found in DFC samples. Ultrasound assistance was used to enhance the mass transfer mechanism that plays a crucial role in DLLME, thus improving the recovery values from all matrices. MEPS is more indicated for high-concentrated samples, providing higher recoveries in all matrices. The methods proposed are simple, need very little amounts of solvents and sample, do not require expensive instrumentation, and can be considered sustainable both for environment and operator. For all these reasons, they can be successfully applied to the forensic analysis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the University Hospital of Ancona (Ospedali Riuniti di Ancona), Italy for the BDZ standards and Agilent Technologies for providing the HPLC instrumentation.

References

- [1] P.T. Anastas, Green chemistry and the role of analytical methodology development, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167–175.
- [2] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [3] M. Tobiszewski, J. Namieśnik, Greener organic solvents in analytical chemistry, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 5 (2017) 1–4.
- [4] A. Galuszka, Z. Migaszewska, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.
- [5] J. Namieśnik, Trends in environmental analytics and monitoring, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 221–269.
- [6] S. Armenta, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *Green Microextraction, Analytical Microextraction Techniques*, Bentham Science, ebook, 2015.
- [7] F. Pena-Pereira, A. Kloskowski, J. Namieśnik, Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives, *Green Chem.* 17 (2015) 3687–3705.
- [8] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 2–8.
- [9] C.L. Arthurs, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [10] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9.
- [11] S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 1–9.
- [12] E.G. Primel, S.S. Caldas, L. Cardoso Marube, A.L. Venquiaruti Escarrone, An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples, *Trends Environ. Anal. Chem.* 14 (2017) 1–18.
- [13] A. Zgoła-Grzeškowiak, T. Grzeškowiak, Dispersive liquid–liquid microextraction, *Trends Anal. Chem.* 30 (9) (2011) 1382–1399.
- [14] M. Saraji, M.K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction, microextraction techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2027–2066.
- [15] L. Kocurova, I.S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andrich, Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchem. J.* 102 (2012) 11–17.
- [16] W.C. Tsai, S.D. Huang, Dispersive liquid–liquid microextraction with little solvent consumption combined with gas chromatography–mass spectrometry for the pretreatment of organochlorine pesticides in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5171–5175.
- [17] A.C. Alves, M.M. Gonçalves, M.M. Bernardo, B.S. Mendes, Validated dispersive liquid–liquid microextraction for analysis of organophosphorous pesticides in water, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2475–2481.
- [18] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342–2357.
- [19] R. Jain, R. Singh, Applications of dispersive liquid–liquid micro-extraction in forensic toxicology, *Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 227–237.
- [20] H. Yan, B. Liu, J. Du, G. Yang, K.H. Row, Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of six pyrethroids in river water, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5152–5157.
- [21] S. Cui, Q. Chen, W. Wang, J. Miao, A. Wang, J. Chen, Ultra-preconcentration and determination of multiple pesticides residues in water samples using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and GC–FID, *Chromatographia* 76 (2013) 671–678.
- [22] H. Chen, R. Chen, S. Li, Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1244–1248.
- [23] R. Jain, R. Singh, Applications of dispersive liquid–liquid micro-extraction in forensic toxicology, *Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 227–237.
- [24] J.A. Hall, C.B.T. Moore, Drug facilitated sexual assault – a review, *J. Forensic Legal Med.* 15 (2008) 291–297.
- [25] B. Madea, F. Musshoff, Knock out drugs: their prevalence, modes of actions and means of detection, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (2009) 341–347.
- [26] C.M. Beynon, C. McVeigh, J. McVeigh, C. Leavey, M.A. Bellis, The involvement of drugs and alcohol in drug-facilitated sexual assault: a systematic review of the evidence, *Trauma Violence Abuse* 9 (2008) 178–188.
- [27] M. Hurley, H. Parker, D.L. Wells, The epidemiology of drug facilitated sexual assault, *J. Clin. Forensic Med.* 13 (2006) 181–185.
- [28] P. Xiang, M. Shen, O.H. Drummer, Drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes, *J. Forensic Legal Med.* 36 (2015) 126–135.
- [29] L. Magrini, A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma, Microextraction by packed sorbent (MEPS)–UHPLC–UV: a simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 125 (2016) 48–53.
- [30] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 34–44.

- [31] G. Famiglini, F. Capriotti, P. Palma, V. Termopoli, A. Cappiello, The rapid measurement of benzodiazepines in a milk-based alcoholic beverage using QuEChERS extraction and GC–MS analysis, *J. Anal. Toxicol.* 39 (4) (2015) 306–312.
- [32] M. Walles, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase micro-extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 85–92.
- [33] W.M. Mullett, K. Levsen, D. Lubda, J. Pawliszyn, Bio-compatible in-tube solid-phase micro-extraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 325–334.
- [34] K. Johansen Reubsæet, H. Ragnar Norli, P. Hemmersbach, K.E. Rasmussen, Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase micro-extraction and gas chromatography; rationalization of method development using experimental design strategies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 667–680.
- [35] M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317–321.
- [36] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 34–44.
- [37] G. Alves, M. Rodrigues, A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis, *Bioanalysis* 5 (11) (2013) 1409–1442.
- [38] H. Elmongy, H. Ahmed, A. Wahbi, A. Amini, A. Colmsjö, M. Abdel-Rehim, Determination of metoprolol enantiomers in human plasma and saliva samples utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 30 (2016) 1309–1317.
- [39] M. Abdel-Rehim, Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2569–2580.
- [40] M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS). A tutorial, *Anal. Chim. Acta* 701 (2011) 119–128.
- [41] W.M. Mullett, J. Pawliszyn, Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1081–1087.
- [42] L. Meng, B. Zhu, K. Zheng, S. Fu, Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 1053 (2017) 9–15.
- [43] P. Fernández, C. González, M.T. Pena, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 88–96.
- [44] M. Fisichella, S. Odoardi, S. Strano-Rossi, High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) and application to forensic cases, *Microchem. J.* 123 (2015) 33–41.
- [45] M. Acikkol, S. Mercan, S. Karadayi, Simultaneous determination of benzodiazepines and ketamine from alcoholic and nonalcoholic beverages by GC–MS in drug facilitated crimes, *Chromatographia* 70 (2009) 1295–1298.
- [46] L.R. Brenneisen, L. Raymond, Pharmacology of flunitrazepam and other benzodiazepines, in: S.J. Salamone (Ed.), *Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology*, Humana Press, Totowata, NJ, 2001, pp. 1–20.
- [47] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICHQ2(R1), 2005.
- [48] J.A. Venegas-Sánchez, M. Tagaya, T. Kobayashi, Ultrasound stimulus inducing change in hydrogen bonded crosslinking of aqueous polyvinyl alcohols, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 295–309.

CONCLUSIONI

Un protocollo DLLME per l'estrazione di otto benzodiazepine è stato sviluppato "ex-novo" sulla base di dati di letteratura. I principali parametri come tipologia e volume di solvente estraente, di solvente dispersivo, concentrazione di NaCl sono stati oggetto di ottimizzazione. Le migliori prestazioni per l'estrazione di 1 ml di campione sono state individuate in 200 μ L di CH_2Cl_2 (estrattore), 300 di CH_3CN (dispersivo) e 250 mg di NaCl. Le estrazioni sono state ripetute sia con agitazione manuale (DLLME) che con ultrasuoni (UA-DLLME). I risultati sono stati comparati a quelli ottenuti con il protocollo MEPS sviluppato da Magrini et. al (24).

Tutti i tre metodi hanno mostrato prestazioni soddisfacenti e riproducibili per tutte le matrici; in particolare la metodica DLLME mostra risultati ottimi su campioni a bassa concentrazione e solo discreti a concentrazione elevata. L'uso degli ultrasuoni nella UA-DLLME non migliora particolarmente le prestazioni, dimostrando che il trasferimento di materia non è il fattore limitante. Le estrazioni liquido-liquido si sono dimostrate poco sensibili alla composizione della matrice. Diversamente, l'estrazione MEPS estrae gli analiti con efficienza nei campioni più concentrati, diversamente dai meno concentrati dove la situazione è opposta. La MEPS inoltre risente della composizione della matrice, dando risultati non comparabili per campioni alla stessa concentrazione ma con matrice diversa.

Entrambi i protocolli sono riusciti a soddisfare i requisiti della GAC senza limitazioni alle prestazioni. Ulteriori studi seguiranno per individuare qualche strategia in modo da migliorare i risultati della DLLME per campioni a concentrazione elevata.

COPYRIGHTS

Tutte le immagini presenti in questa tesi di dottorato sono state riportate in accordo con la regolamentazione sui diritti d'autore delle riviste. L'uso di immagini, tabelle o altre parti dell'articolo è stata fatta per finalità limitate alla destinazione d'uso della tesi ed ogni impiego per finalità commerciali è severamente vietato senza il permesso esplicito. Sul Copyright Clearance Center sono stati registrati tutti i contenuti utilizzati per cui è stato richiesto un permesso.

Per i due articoli riportati per intero nella parte sperimentale, è riportato di seguito il permesso esplicito per la riproduzione integrale.



[Home](#) [Create Account](#) [Help](#) 

 **ACS Publications** Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Title: Atmospheric Pressure Vaporization Mechanism for Coupling a Liquid Phase with Electron Ionization Mass Spectrometry

Author: Veronica Termopoli, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, et al

Publication: Analytical Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

LOGIN

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2018 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer care@copyright.com



Title: Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection

Author: Maurizio Piergiovanni, Achille Capiello, Giorgio Famiglini, Veronica Termopoli, Pierangela Palma

Publication: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Publisher: Elsevier

Date: 30 May 2018

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

[LOGIN](#)

If you're a **copyright.com user**, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2018 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

BIBLIOGRAFIA

1. Wikipedia. Wikipedia. www.wikipedia.org. [Online] 17 08 2018.
https://it.wikipedia.org/wiki/Chimica_analitica.
2. *Theory of analytical chemistry*. Kowalski, K.L. Booksh and B.R. 66, s.l. : American Chemical Society, 1994.
DOI: 10.1021/ac00087a001.
3. *A modern definition of analytical chemistry*. Valcárcel, Miguel. 3, s.l. : TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1997, Vol. 16.
4. *TRENDS IN ENVIRONMENTAL ANALYTICS AND MONITORING*. Namiènsnik, Jacek. Gdansk : s.n., 2003, Vol. 14.
5. Peumery, Jean-Jacques. *Histoire illustrée du diabète: de l'antiquité à nos jours*. Parigi : Editions Roger Dacosta, 1987.
6. *The limit od detection*. Yvan Vander Heyden, Ricard Boqué. 2, s.l. : LCGC Europe, 2009, Vol. 22.
7. Hale, William Jay. *The Farm Chemurgic: farmward the star of destiny lights our way*. California : Stratford Company, 1934.
8. *Green chemistry and the role of analytical methodology development*. Anastas, P.T. s.l. : Critical Reviews in Analytical Chemistry, 1999, Vol. 29.
9. Prize, Nobel. Nobel Prize. www.nobelprize.com. [Online] 03 10 2018. [Riportato: 12 10 2018.]
10. *Trends in environmental analytics and monitoring*. J. Namiesnik. 221-269, s.l. : Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2000, Vol. 30.
11. *The social responsibility of environmental analysis*. M. de la Guardia, S. Garrigues,. 7-13, s.l. : Trends in Environmental Analytical Chemistry, 2014, Vol. 3-4.
12. *The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry*. Sergio Armenta, Salvador Garrigues, Miguel de la Guardia. 2-8, Valencia : Trends in Analytical Chemistry, 2015, Vol. 71.
13. *Green chemistry and environmental friendly technologies*. Clark, J. H. Weinheim : WILEY-VCH, 2005.
14. *An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry*. Trufelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A. 3, s.l. : Mass Spectrometry review, 2011.
15. *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS*. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. 75, 3019., s.l. : ACS, 2003, Vol. Analytical Chemistry.
16. *Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Elisabetta Pierini, Veronica Termopoli, and Helga Trufelli. 80, s.l. : Analytical chemistry, 2008.
17. Pawliszyn, Janusz. *Solid Phase Microextraction*. s.l. : Elsevier, 1997.
18. *Ultrasonication for analytical chemistry*. J.L. Capelo, A.M. Mota,. 193-201, s.l. : Curr. Anal. Chem., 2005, Vol. 1.

19. Daniele Naviglio, Lydia Ferrara. *Tecniche estrattive solido - liquido (Teoria e pratica)*. Roma : Aracne, 2008. ISBN 978-88-548-1544-5.
20. Watkinson, Andrew. *Antibiotics and Antibiotic Resistant Bacteria in the Aquatic Environment: A Global Issue, an Australian Perspective*. s.l. : University of Queensland, 2008.
21. *Fluorous solid-phase extraction (F-SPE) as a pilot tool for quantitative determination of perfluorochemicals in water samples coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Chen Xu, a Jiajun Zhu, a Yan Li, a Yingjia Yu* a and Gengli Duan*. s.l. : RCS Advances, 2015, Vol. 17.
22. Giorgia Purcaro, Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte. *Il campione per l'analisi chimica*. s.l. : Springer - Verlag Italia, 2014. DOI 10.1007/978-88-470-5738-8_7.
23. *SPME in environmental analysis*. Pawliszyn, Gangfeng Ouyang and Janusz. s.l. : Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, Vol. 386.
24. Moein., Mohammad Mahdi. Researchgate. [Online] April 2015. [Riportato: 06 November 2018.] https://www.researchgate.net/publication/282777610_Microextraction_by_packed_sorbent.
25. *Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: A simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in alcoholic beverage*. Laura Magrini, Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma. 48 - 53, s.l. : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, Vol. 125.
26. *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. Mohammad Rezaee, Yaghoub Assadi, Mohammad-Reza Milani Hosseini, Elham Aghaee, Fardin Ahmadi, Sana Berijani. 1-9, s.l. : Journal of Chromatography A, 2006, Vol. 1116.
27. *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water*. Sana Berijani, Yaghoub Assadi, Mansoor Anbia, Mohammad-Reza Milani Hosseini, Elham Aghaee. 1-9, s.l. : Journal of CHromatography A, 2006, Vol. 1123.
28. *An overview of advances in dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples*. Ednei Gilberto Primel, Sergiane Souza Caldas, Liziane Cardoso Marube, Ana Laura Venquiaruti Escarrone. 1-18, s.l. : Trends in Environmental Analytical Chemistry, 2017, Vol. 14.
29. *Greener organic solvents in analytical chemistry*. Namiesnik, Marek Tobiszewski and Jaeck. 1-4, s.l. : Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2017, Vol. 5.
30. *Salting-Out Effect in Aqueous NaCl Solutions: Trends with Size and Polarity of Solute Molecules*. Satoshi Endo, Andrea Pfennigsdorff, and Kai-Uwe Goss. 46, s.l. : Environ. Sci. Technol., 2012, Vol. 3.
31. *The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol)*. Michael J., HeyDaniel P., JacksonHongYan. 8, s.l. : Polymer, 2005, Vol. 46.
32. *Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples*. Zhang J, Gao H, Peng B, Li S, Zhou Z. 9, s.l. : Journal of Chromatography A, 2011, Vol. 23.
33. *Impacts of Typhoon Soudelor (2015) on the water quality of Taipei, Taiwan*. Hoda Fakour, Shang-Lien Lo & Tsair-Fuh Lin. 6, s.l. : Nature, 2016, Vol. 25288.

34. *Ultrasound assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction (US-DLLME)-a fast new approach to measure phthalate metabolites in nails.* Alves A, Vanermen G, Covaci A, Voorspoels S. 408, s.l. : Anal. Bioanal. Chem., 2016, Vol. 22.
35. *Ultrasound stimulus inducing change in hydrogen bonded crosslinking.* Venegas-Sánchez Josué Addiel, Tagaya Motohiro, Kobayashi Takaomi. s.l. : Ultrasonics Sonochemistry, 2014, Vol. 21.
36. *Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for.* W. Ahmad, A.A. Al-Sibaai, A.S. Bashammakh, H. Alwael, M.S. El-Shahawi. 181 - 192, s.l. : Trends in Analytical Chemistry, 2015, Vol. 72.
37. *Permselectivity and microstructure of anion exchange membranes.* XT1, Le. 9, s.l. : Journal of colloid and interface science, 2008, Vol. 325.
38. *Quantitation of trace phenolic compounds in water by trap-and-release membrane introduction mass spectrometry after acetylation.* R. Sparrapan, M.N. Eberlin, R.M. Alberici,. s.l. : Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, Vol. 24.
39. *An Enzyme Derivatized Polydimethylsiloxane (PDMS) Membrane for Use in Membrane Introduction Mass Spectrometry (MIMS).* A. Skye Creba, Alexandra N. E. Weissfloch, Erik T. Krogh, and Chris G. Gill. 18, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007.
40. *Membrane-introduction mass spectrometry (MIMS).* Nicholas G. Davey, Erik T. Krogh, Chris G. Gill. 9, s.l. : Trends in Analytical Chemistry, 2011, Vol. 30.
41. *Chapter 16 Membrane inlet mass spectrometry.* Lauritsen, Tapio Kotiaho Frants R. s.l. : Comprehensive Analytical Chemistry, 2002, Vol. 37.
42. *Environmental applications of membrane introduction mass spectrometry.* Ketola RA, Kotiaho T, Cisper ME, Allen TM. 5, s.l. : Journal of Mass Spectrometry, 2001, Vol. 37.
43. *Use of Nafion as a Membrane Separator in Membrane Introduction Mass Spectrometry.* Matilda Gernátová, Pavel Janderka, Andrea Marcinková, Petr Ostřížek. s.l. : European Journal of Mass Spectrometry, 2009, Vol. 15.
44. D. Barcelò, P. Palma, A. Cappiello. *Advances in the Use of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS): Instrumentation Developments and Applications.* s.l. : Wilson & Wilson's (Elsevier), 2005.
45. *An enzyme derivatized polydimethylsiloxane (PDMS) membrane for use in membrane introduction mass spectrometry (MIMS).* Gill, A. Skye CrebaAlexandra N. E. WeissflochErik T. KroghChris G. 6, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007, Vol. 18.
46. *The development of partition chromatography.* Martin, Archer J. P. Amsterdam : Elsevier, 1964.
47. Restek. Restek Searchable Chromatogram Library. [Online] Restek, 2018. [Riportato: 01 October 2018.] http://www.restek.com/chromatogram/view/LC_GN0579.
48. *Creating a Central Science: A brief history of 'color writing.* Lesney, Mark S. 8, s.l. : Today's chemist at work, 1998, Vol. 7.
49. *History of Chromatography.* Touchstone, Joseph C. 8, s.l. : Journal of Liquid Chromatography, 1993, Vol. 16.
50. AB, Nobel Media. The Nobel Prize in Chemistry 1952. 2018. Mon. 1 Oct 2018. . *NobelPrize.org*. [Online] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1952/summary/>.

51. *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography*. van Deemter JJ, Zuiderweg FJ and Klinkenberg A. s.l. : Chemical Engineering Science, 1956, Vol. 5.
52. *How do small particle size columns increase sample throughput?* Lake, Rick. s.l. : Pharmaceutical Innovations Chemist, 2018.
53. *A theoretical study of the separation principle in Size Exclusion Chromatography*. Wang, Y., et al. s.l. : Macromolecule, 2010, Vol. 43.
54. *Early milestones in the development of ion-exchange chromatography: a personal account*. J., Fritz. s.l. : Journal of Chromatography A, 2004, Vol. 1039.
55. Pavia, L., Gary M. Lampman, George S. Kritz, Randall G. Engel. *Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.)*. s.l. : Thomson Brook, 2006. ISBN 978-0-495-28069-9.
56. *Reverse-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high-performance liquid chromatography*. Horváth, I Molnár and C. 9, s.l. : Clinical Chemistry, 1976, Vol. 22.
57. *Nano-Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Research*. Mariana Roberto Gama, Carol H. Collins and Carla B.G. Bottoli. 7, s.l. : Journal of Chromatographic Science, 2013, Vol. 51.
58. *Multidimensional nano-hplc for analysis of protein complexes*. Yvonne Wagner, Albert Sickmann, Helmut E. Meyer, Günther Daum. 9, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003, Vol. 14.
59. *Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters*. Karl Erik. Karlsson, and Milos. Novotny. 17, s.l. : Analytical Chemistry, 1988, Vol. 60.
60. Researchgate. www.researchgate.com. [Online] [Riportato: 08 September 2018.]
61. *Nano-HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation*. Ryan G. Brennan, Su-Ann E. O'Brien Murdock, Maryam Farmand, Kaveh Kahen, Salar Samii, Jessica M. Graya and Akbar Montaser. s.l. : Journal of Analytical Atomic Spectroscopy, 2007, Vol. 9.
62. *Protocol for the analysis of phenolic compounds using nano-liquid chromatography-mass spectrometry and Caco-2 assays: from the evaluation of the uptake to the enterocyte metabolism*. María del Mar Contreras, Aránzazu Morales-Soto, David Arráez-Román, Alberto Fernández-Gutiérrez & Antonio Segura-Carretero. s.l. : Nature, 2015, Vol. 103. doi:10.1038/protex.2015.103.
63. *Unknown identification using reference mass spectra. quality evaluation of databases*. Fred W. McLafferty, Douglas A. Stauffer, Stanton Y. Loh, Chrysotomos and Wesdemiotis. 10, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999, Vol. 12.
64. Gross, Jurgen H. *Spettrometria di massa*. s.l. : Edises, 2016.
65. Bombick, Daniel. *The Use of Thermionic Emission Materials in Mass Spectrometry and Gas Chromatography*. s.l. : Michigan State University. Department of Chemistry, 1986.
66. Gross, Jurger H. *Practical Aspects of Electron Ionization*. s.l. : Springer, 2018.
67. NIST. NIST. www.nist.com. [Online] [Riportato: 06 November 2018.]
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C15687271&Units=CAL&Mask=200#Mass-Spec>.
68. Jon Wong, Daniele Canzani, Francesco Cacciola, Fadi Aldeek. *LC-MS/MS Methods for Food and Beverage Analysis*. s.l. : LCGC, 2018.

69. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Fenn, J. B., et al. s.l. : Science, 1989, Vol. 246.
70. *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002"*. Markides, K e Gräslund, A.
71. *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?* MatthiasMann, Matthias S.Wilm and. 2-3, s.l. : International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1994, Vol. 136.
72. *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. Taylor, Geoffrey. 1382, s.l. : Royal Society, 1967, Vol. 280.
73. *The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces*. Zeleny, John. 69, s.l. : Physical Review, 1914, Vol. 3.
74. *Tuning compounds for electrospray ionization/in-source collision-induced dissociation and mass spectra library searching*. Wolfgang Weinmann, Mylène Stoertzel, Susanne Vogt, Michal Svoboda and André Schreiber. 9, s.l. : Journal of Mass Spectrometry, 2001, Vol. 36.
75. *Collisional activation and collision-activated dissociation of large multiply charged polypeptides and proteins produced by electrospray ionization*. Udseth, Richard D. SmithJoseph A. LoaCharles J. BarinagaCharles G. EdmondsHarold R. 1, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1990, Vol. 1.
76. *Influence of Pressure in the First Pumping Stage on Analyte Desolvation and Fragmentation in Nano-ESI MS*. Andrea Schmidt, Ute Bahr, and Michael Karas. 24, s.l. : Analytical Chemistry, 2001, Vol. 73.
77. Scientific, Thermo. [Online] <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Thermo-Scientific/CMD/Marketing-Images/Communities/food-beverage/gen/general-electrospray-ionization-740x300.jpg>.
78. CHROMacademy. *Mass Spectrometry - Fundamental LCMS - Electrospray Ionisation*. s.l. : LCGC, 2018.
79. *Negative Ion Mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry Study of Ammonium-Counter Ion Clusters*. R.S.Houk, N.B.Lentz and. 2, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007, Vol. 18.
80. *Electrospray: from Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What we Konw Now*. Verkerk, Paul Kebarle and Udo H. s.l. : Mass Spectrometry Reviews, 2009, Vol. 28.
81. *Efficiency of Nano-Electrospray Ionization*. AymanEl-Faramawy, K.W. Michael Siu and Bruce A.Thomson. 10, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005, Vol. 16.
82. *Molecular analysis by mass spectrometry*. Jr., Ligon WV. 205, s.l. : Science, 1979, Vol. 13.
83. *Instrumentation for mass spectrometry: 1997*. McLuckey, Scott A. s.l. : Oak Ridge National Laboratory, 1997.
84. *Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory; determination of pesticides in water by C-18 solid-phase extraction and capillary-column gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring*. Steven D. Zaugg, Mark W. Sandstrom, Steven G. Smith, and Kevin M. Fehlberg. s.l. : U.S. Geological Survey : Open-File Reports Section, 1995, Vol. 49.
85. *Direct infusion-SIM as fast and robust method for absolute protein quantification in complex samples*. Christina Looße, Sara Galozzi, Linde Debor, Mattijs K.Julsing, Bruno Bühler, Andrea Schmid, Katalin Barkovits, Thorsten Müller, Katrin Marcus. s.l. : EuPA Open Proteomics, 2015, Vol. 7.

86. Robert H. Bateman, Peter Burns. *Magnetic Sector Mass Spectrometer*. 4,727,249 United States of America, 23 Feb 1988.
87. Kenneth A. Robinson, Judith F. Robinson. *Chimica analitica strumentale*. Bologna : Zanichelli, 2002. ISBN 88-08-08959-2.
88. *Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry*. Honour, John. 6, s.l. : Annals of Clinical Biochemistry, 2003, Vol. 40.
89. Uthe, P. Micheal. *QUADRUPOLE MASS ANALYZER*. 3,457,404 United States of America, 22 July 1969.
90. Ding, Chuan-Fan. *ION TRAPMASS ANALYZER*. 7.498,569 B2 United States of America, 3 March 2009.
91. *A time-of-flight mass analyzer with high resolving power*. Matsuda, R. Grix R. Kutscher G. Li U. Grüner H. Wollnik H. 5, s.l. : Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988, Vol. 2.
92. *Oligomers formed through in-cloud methylglyoxal reactions: Chemical composition, properties, and mechanisms investigated by ultra-high resolution FT-ICR mass spectrometry*. K.E. Altieri, S.P. Seitzinger, A.G. Carlton, B.J. Turpin, G.C. Klein, A.G. Marshall. s.l. : Atmospheric Environment, 2008, Vol. 42.
93. *Tandem mass spectrometry*. McLafferty, FW. 4518, s.l. : Science, 1981, Vol. 214.
94. *Electromagnetic traps for charged and neutral particles*. Paul, Wolfgang. 3, s.l. : Reviews of Modern Physics, 1990, Vol. 62.
95. *Mathieusche Funktionen und Sphäroidfunktionen*. xner, Josef, Schäfer, Friedrich Wilhelm. 1954 : Mit Anwendungen auf Physikalische und Technische Probleme.
96. *H/D exchange of gas phase bradykinin ions in a linear quadrupole ion trap*. Mao D, Douglas DJ. 2, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003, Vol. 14.
97. *Array detection of mass spectra, a comparison with conventional detection methods*. Boerboom, A. J. H. 11, s.l. : Journal of Mass Spectrometry, 1991, Vol. 26.
98. Photonis. *Photonis.com*. [Online] 2015. [Riportato: 30 September 2018.]
<https://www.photonis.com/channeltron%C2%AE-electron-multipliers>.
99. *Direct Liquid Introduction interface* . J. Yinon, D. G. Hwang. s.l. : Journal of Chromatography, 1983, Vol. 268.
100. *On-line direct liquid introduction interface for micro-liquid chromatography/mass spectrometry: application to drug analysis*. C Eckers, D S Skrabalak, J Henion. 9, s.l. : Clinical Chemistry, 1982, Vol. 28.
101. Lemièrè, Filip. *Interfaces for LC–MS. Guide to LC-MS*. 2001.
102. *LC/MS studies with moving belt interfaces*. D. E. Games, N. J. Alcock, L. Cobelli, C. Eckers, M. P. L. Games, A. Jones, M. S. Lant, M. A. McDowall, M. Rossiter, R. A. Smith, S. A. Westwood, H. -Y. Wong. s.l. : International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, 1983, Vol. 46.
103. Hsu, Chang S. *Coupling Mass Spectrometry with Liquid Chromatography for Petroleum Research. Analytical Advances for Hydrocarbon Research*. s.l. : Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2003.
104. *Simplified moving-belt interface for liquid chromatography/mass spectrometry*. Steven J. Stout, and Adrian R. DaCunha. 8, s.l. : Analytical Chemistry, 1985, Vol. 57.

105. *A comparison of thermospray and direct liquid introduction high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of candidate antimalarials.* Voyksner RD, Bursey JT, Hines JW, Pellizzari ED. 12, s.l. : Biomedical Mass Spectrometry, 1984, Vol. 11.
106. *Liquid chromatograph-mass spectrometer for analysis of nonvolatile samples.* Blakley, C. R., Carmody, J. J. e Vestal, M. L. 11, s.l. : Analytical Chemistry, 1980, Vol. 52.
107. Neissen, W.M.A. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition).* 2017.
108. *Thermospray ionization liquid chromatography mass spectrometry: a new and highly specific technique for the analysis of bile acids.* Vestal, K. D. R. Setchell and C. H. s.l. : Journal of Lipid research, 1989, Vol. 30.
109. Zhou, Leon Z. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC.* s.l. : Separation Science and Technology, 2005.
110. *Vapor Pressures of Substituted and Unsubstituted Monocarboxylic and Dicarboxylic Acids Measured Using an Improved Thermal Desorption Particle Beam Mass Spectrometry Method.* J.Ziemann, Sulekha Chattopadhyay and Paul. 11, s.l. : Aerosol Science and Technology, 2005, Vol. 39.
111. *Analysis of Coumarins by Micro High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with a Particle Beam Interface.* Achille Cappiello, Bruno Tirillini, Giorgio Farniglini, Filippo Mangani. s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1995, Vol. 6.
112. *Electron Capture Ionization of Explosives with a Microflow Rate Particle Beam Interface.* Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Antonietta Lombardozzi, Alessandro Baldassarri, Gianni Giulio Vadalà. 7, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996.
113. *Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy.* Ross C. Willoughby, and Richard F. Browner. 14, s.l. : Analytical Chemistry, 1984, Vol. 56.
114. *Enhanced detection sensitivity by large volume injection in reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography.* Mehdi Attaran Rezai, Giorgio Famiglini, Achille Cappiello. s.l. : Journal of Chromatography A, 1996, Vol. 742. S0021-9673(96)00240-3.
115. *Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of phenolic compounds using a capillary-scale particle beam interface.* Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Filippo Mangani, Maria Careri, Paola Lombardi, Claudio Mucchino. s.l. : Journal of Chromatography A, 1999, Vol. 855.
116. *Particle beam interface for liquid chromatography/mass spectrometry.* Woodfin V. Ligon, and Steven B. Dorn. 23, s.l. : Analytical Chemistry, 1990, Vol. 62.
117. *Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water.* Damià Barcelò, Marie-Claire Hennion. s.l. : Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, 1997, Vol. 18.
118. *Micro flow rate particle beam interface for capillary liquid chromatography/mass spectrometry.* Achille. Cappiello, and Fabrizio. Bruner. 9, s.l. : Analytical Chemistry, 1993, Vol. 65.
119. *A Simple Approach for Coupling Liquid Chromatography and Electron Ionization Mass Spectrometry.* Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Filippo Mangani, and Pierangela Palma. s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002, Vol. 13.
120. *New trends in the application of electron ionization to liquid chromatography-mass spectrometry interfacing.* Cappiello A, Famiglini G, Mangani F, Palma P. 2, s.l. : Mass Spectrometry review, 2001, Vol. 20.

121. *A new liquid chromatography–mass spectrometry approach for generic screening and quantitation of potential genotoxic alkylation compounds without derivatization*. Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Veronica Termopoli, Helga Trufelli. s.l. : Journal of Chromatography A, 2012, Vol. 1255. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.068.
122. *Advanced Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Interface Based on Electron Ionization*. Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Elisabetta Pierini, Pierangela Palma, and Helga Trufelli. 14, s.l. : Analytical Chemistry, 2007, Vol. 79.
123. *Single-Step LC/MS Method for the Simultaneous Determination of GC-Amenable Organochlorine and LC-Amenable Phenoxy Acidic Pesticides*. Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Veronica Termopoli, Helga Trufelli and Achille Cappiello. 17, s.l. : Analytical Chemistry, 2009, Vol. 81.
124. Wikipedia. [Online] 22 5 2017. [Riportato: 25 9 2018.]
https://en.wikipedia.org/wiki/Direct_electron_ionization_liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry_interface.
125. *DIRECT-ESI IN LC–MS: TOWARDS A UNIVERSAL DETECTOR FOR SMALL-MOLECULE APPLICATIONS*. Achille Cappiello, * Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Elisabetta Pierini, Veronica Termopoli, and Helga Trufelli. s.l. : Mass Spectrometry Reviews, 2011. DOI 10.1002/mas.20329.
126. *Sol-gel coated ion sources for liquid chromatography-direct electron ionization mass spectrometry*. s.l. : Analytica Chimica Acta, 2017, Vol. 978. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.026>.
127. *Application of nano-FIA-Direct-ESI-MS to determine diethylene glycol in produced formation water discharges and seawater samples*. Achille Cappiello, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Elisabetta Pierini, Helga Trufelli, Chiara Maggi, Loredana Manfra and Michela Mannozi. s.l. : Chemosphere, 2007, Vol. 69.
128. *Liquid chromatography mass spectrometry with supersonic molecular beams*. Granota, Aviv Amirav and Ori. 6, s.l. : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000, Vol. 11.
129. *Comparison of electrospray LC–MS, LC–MS with Cold EI and GC–MS with Cold EI for sample identification*. SvetlanaTsizin, Ramesh Bokka, Uri Keshet, Tal Alon, Alexander B. Fialkov, Noam Tal, Aviv Amirav. 9, s.l. : International Journal of Mass Spectrometry, 2017, Vol. 422.
130. *The Rapid Measurement of Benzodiazepines in a Milk-Based Alcoholic Beverage Using QuEChERS Extraction and GC-MS Analysis*. Famiglini G, Capriotti F, Palma P, Termopoli V, Cappiello A. 4, s.l. : Journal of Analytical Toxicology, 2015, Vol. 39.
131. *A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma sample*. Purificación Fernández, Cristina González, M. Teresa Pena, Antonia M. Carro, Rosa A. Lorenzo. s.l. : Analytica Chimica Acta, 2013, Vol. 767.
132. *Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for ultra performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital wastewater*. P. Fernandez, M. Regenjo, A. M. Fernandez, R. A. Lorenzo and A. M. Carro. 6, s.l. : Analytical Methods, 2014, Vol. 8239. DOI: 10.1039/c4ay01348d.
133. Chemistry, © Royal Society of. www.chemspider.com. [Online] © Royal Society of Chemistry. [Riportato: 15 10 2018.] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.25935559.html>.
134. *Sol-gel coated ion sources for liquid chromatography-direct electron ionization mass spectrometry*. Riboni Nicola Magrini Laura, Bianchi Federica, Careri Maria, Cappiello Achille. s.l. : Analytica Chimica Acta, 2017, Vol. 25. doi: 10.1016/j.aca.2017.04.026.

135. Electrical engineering. [Online] [Riportato: 2018 10 22.]
136. Society, Royal Chemistry. chemspider. [Online] Royal Chemistry Society. [Riportato: 22 10 2018.] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.864.html?rid=8c04f229-0efe-48d5-93ff-388d14fc164a&page_num=0.
137. *Agilent Infinity UHPLC Nanodapter*. Technologies, Agilent. Santa Clara (CA) : s.n., 2016. 5991-7561EN.
138. *Deoxycholic Acid: A Review in Submental Fat Contouring*. Deeks, Emma D. 6, s.l. : American Journal of Clinical Dermatology , 2018, Vol. 17. DOI: 10.1007/s40257-016-0231-3.
139. *Journey of Generic Imatinib: A Case Study in Oncology Drug Pricing* . Kesselheim, Christopher T. Chen and Aaron S. s.l. : Journal of Clinical Oncology, 2017.
140. *Recent developments on electrochemical flow injection in*. Sevinc Kurbanoglu, Mehmet Altay Unal, Sibel A. Ozkan. s.l. : Electrochimica Acta, 2018, Vol. 287. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.217>.
141. *Flow injection analysis: An approach via linear non-equilibrium*. Kuznetsov, Vladimir V. s.l. : Talanta, 2018, Vol. 187. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.048>.
142. *Flow injection analysis in lab-on-paper format*. Mateusz Granica, Marta Fiedoruk-Pogrebniak, Robert Koncki, Łukasz Tymecki. s.l. : Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, Vol. 257. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.088>.
143. *Reverse flow-injection analysis*. Fotouh R. Mansour, Neil D. Danielson. s.l. : Trends in Analytical Chemistry, 2012, Vol. 40. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.06.006>.
144. *Recycling of plastic waste: Presence of phthalates in plastics from households and industry*. K. Pivnenko, M. K. Eriksen, J. A. Martín-Fernández, E. Eriksson, T. F. Astrupa. s.l. : Waste Management, 2016, Vol. 54.
145. *Analysis of the phthalates in cosmetics by capillary gas chromatography*. Chen H., Wang C., Wang X. 3, s.l. : Chinese Journal of Chromatography, 2004, Vol. 22.
146. *Estimated Exposure to Phthalates in Cosmetics*. Hyun Jung Koo, Byung Mu Lee. s.l. : Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 2004, Vol. 67. DOI: 10.1080/15287390490513300.
147. *Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes*. John D. Meeker, Sheela Sathyanarayana, and Shanna H. Swan. 364, s.l. : Philosophical Transactions B, 2009, Vol. 1526.
148. *Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets: I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study*. Tomonari Y., Kurata Y., David R.M., Gans G., Kawasuso T., Katoh M. 17, s.l. : Journal of Toxicology and Environmental Health, 2006, Vol. 69.
149. *Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females*. Vanessa R. Kay, Christina Chambers, and Warren G. Foster. 3, s.l. : Critical Reviews in Toxicology, 2013, Vol. 43.
150. *Pervasive Environmental Toxin Linked to Pregnancy Loss*. Johnson, Kate. s.l. : American Society for Reproductive Medicine (ASRM) 2015 Annual Meeting, 2015.
151. Agency, U.S. Environmental Protection. *Phthalates*. s.l. : Assessing and Managing Chemicals under TSCA, 2012.

152. Commission, European. Commission decision of 7 december 1999. s.l. : Official Journal of the European Communities, 1999.
153. Staff, Mayo Clinic. Mediterranean diet: A heart-healthy eating plan. *Healthy Lifestyle*. 2017.
154. *Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. Trichopoulou, Theodora Psaltopoulou Androniki Naska Philippos Orfanos Dimitrios Trichopoulos Theodoros Mountokalakis Antonia. 4, s.l. : The American Journal of Clinical Nutrition, 2004, Vol. 80. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.4.1012>.
155. *Mediterranean diet, olive oil and cancer*. Menéndez, Ramón ColomerJavier A. 1, s.l. : Clinical and Translational Oncology, 2006, Vol. 8.
156. *Phenols and Polyphenols from Argania spinosa*. Guillaume, Z. Charrouf and D. s.l. : American Journal of Food Technology, 2007, Vol. 72.
157. *Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells*. Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, Malorni W, Masella R. 7, s.l. : Journal of Nutrition, 1999, Vol. 129.
158. *Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol*. Jose Rodriguez-Moratò, Anna Boronat, Aristotelis Kotronoulas, Mitona Pujadas, Antoni Pastor, Eulaia Olesti, Clara Pèrez-Mana, Olha Khymenets, Montserrat Fitò, Fagì Farrè, and Rafael de la Torre. 2, s.l. : Drug Metabolism Reviews, 2016, Vol. 48. <https://doi.org/10.1080/03602532.2016.1179754>.
159. *Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS*. Cristina Vilaplana-Pérez, David Auñón, Libia A. García-Flores, and Angel Gil-Izquierdo. 1, s.l. : Frontiers in Nutrition, 2014, Vol. 18. [10.3389/fnut.2014.00018].
160. *Online Reaction Monitoring in Non-Aqueous Solutions by Condensed Phase Membrane Introduction Mass Spectrometry-Liquid Electron Ionization (CP-MIMS-LEI-MS/MS)*. Veronica Termopoli, Gregory W. Vandergrift, Maurizio Piergiovanni, Elena Torrisi, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Erik T. Krogh, Giovanni Zappia, Achille Cappiello and Christopher G. Gill. San Diego, CA : ASMS, 2018.
161. *Determination of Kinetic Parameters using Linearly Increasing Temperature*. SWARTZEL, J. W. RHIM R. V. NUNES V. A. JONES K. R. 2, s.l. : Journal of Food Science, 1989, Vol. 54.
162. *Ignition on catalytic wires: Kinetic parameter determination by the heated-wire technique*. Weller, C. G. Rader S. W. 3, s.l. : AIChE, 1974, Vol. 20. <https://doi.org/10.1002/aic.690200312>.
163. *Integration of Microreactors with Spectroscopic Detection for Online Reaction Monitoring and Catalyst Characterization*. Jun Yue, Jaap C. Schouten, and T. Alexander Nijhuis*. 45, s.l. : Industrial & Engineering Chemistry Research, 2012, Vol. 51.
164. *On-Line Reaction Monitoring and Mechanistic Studies by Mass Spectrometry: Negishi Cross-Coupling, Hydrogenolysis, and Reductive Amination*. Cooks, Xin Yan Ewa Sokol Dr. Xin Li Guangtao Li Dr. Shiqing Xu Prof. R. Graham. 23, s.l. : Angewandte Chemie International Edition, 2014, Vol. 53.
165. *Simultaneous 19F–1H medium resolution NMR spectroscopy for online reaction monitoring*. Nicolai Zientek, Clément Laurain, Klas Meyer, Matthias Kraume, Gisela Guthausen, Michael Maiwald. s.l. : Journal of magnetic resonance, 2014, Vol. 249.
166. *On-Line Reaction Monitoring and Mechanistic Studies by Mass Spectrometry: Negishi Cross-Coupling, Hydrogenolysis, and Reductive Amination*. Cooks, Xin Yan Ewa Sokol Dr. Xin Li Guangtao Li Dr. Shiqing Xu Prof. R. Graham. 23, s.l. : Angewandte Chemie, 2014, Vol. 53.

167. *Continuous flow reaction monitoring using an on-line miniature mass spectrometer*. Ley, Duncan L. Browne Steven Wright Benjamin J. Deadman Samantha Dunnage Ian R. Baxendale Richard M. Turner Steven V. 17, s.l. : Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012, Vol. 26.
168. *Membrane Introduction Mass Spectrometry (MIMS)*. Nicholas G. Davey, Erik Krogh, and Chris G. Gill. 9, s.l. : TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011, Vol. 30.
169. *Drug-facilitated crimes: Definitions, prevalence, difficulties and recommendations. A review*. M. K. S. Shbairab, M. Lhermitte. 3, s.l. : Annales Pharmaceutics Francaises, 2010, Vol. 68.
<https://doi.org/10.1016/j.pharma.2010.03.005>.
170. Olszewski, Deborah. *Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol*. s.l. : European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction, 2008.
171. *Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes*. Marjorie Chèze, Marion Villain, Gilbert Pépin. 2-3, s.l. : Forensic Science International, 2004, Vol. 145.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.066>.
172. EMCDDA. www.emcdda.europa.eu. [Online] 2015. [Riportato: 01 November 2018.]
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/benzodiazepine>.
173. INCB. www.incb.org. [Online] 2015. [Riportato: 01 November 2018.] <https://www.incb.org/>.
174. Björn Hibell, Ulf Guttormsson, Salme Ahlström, Ludwig Kraus, and Ludwig Kraus. *The 2011 ESPAD report—Substance use among students in 36 European Countries*. s.l. : The Swedish Council for Information on Alcohol and other Drugs (CAN), 2012. ISBN 978-91-7278-233-4.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di un percorso di tre anni si vanno a “tirare le somme” ed a fare un bilancio tra le cose che sono andate bene ed a quelle che sono andate meno bene. Per me conseguire il titolo di Dottore di Ricerca è stato un obbiettivo a cui non volevo rinunciare, la ciliegina sulla torta di uno che si ritiene in gamba e vuol dimostrarlo sul campo. Nel 2014, poche settimane dopo la fine della laurea iniziai a lavorare per la Ilva glass S.p.A., un’azienda di medie dimensioni sita a poche centinaia di metri dal casello di Pesaro; fu proprio lì che, abbandonando la cappa a favore di vetro e vetroceramica, compresi che la mia vita aveva preso una direzione insoddisfacente. Di lì in pochi mesi cominciai a controllare le pagine delle principali università italiane a caccia di bandi ed opportunità. Provai ben tre assegni di ricerca, tutti a Bologna, a cui son sempre finito secondo, sorpassato da “quelli col dottorato”; oltre il danno la beffa! Come se avessi bisogno di ulteriori conferme, l’idea di provarci era diventata sempre più forte.

Paradossalmente sono arrivato all’Università di Urbino, la città dove sono nato, cresciuto e vivo ancora, per puro caso; in un ateneo dove non c’è il corso di laurea in chimica perché mai dovrebbe esserci il curriculum di Dottorato in Scienze Chimiche?! Fortunatamente c’è ed in pochi lo sanno! Con tre candidati per tre posti non poteva che andare bene (anche se poi al concorso sono arrivato primo, stavolta “quelli col dottorato” non c’erano!) è così è stato. Lasciare un lavoro VERO con un contratto VERO e prospettive di stabilizzazione è sembrata a tutti una scelta sconveniente; sicuramente lo è stato, come per tutte le decisioni fatte col cuore la convenienza è l’ultimo parametro valutato.

Da lì è stato tutto un crescendo di emozioni, traguardi, successi e soddisfazioni, dal giorno della prima iniezione all’applauso di oltre 1000 persone nell’aula 20C del San Diego convention center alla conferenza annuale del ASMS dopo la mia presentazione orale del 7 giugno 2018. Se in questo tempo è stato possibile ricavare risultati di questo livello le persone da ringraziare sono tantissime.

Il primo ringraziamento va ai miei genitori, roccia solida su cui ho costruito le fondamenta dell’uomo che sono diventato; da loro ho ricevuto sempre tutto quel che era necessario per capire la strada migliore da intraprendere senza mai un veto o un divieto. Questo traguardo, esattamente come le altre due lauree, lo dedico a voi.

Tra le tante cose che ho ricevuto dai miei genitori, qualcosa di meraviglioso sono le rispettive famiglie; persone straordinarie che con la loro presenza, discreta ma costante, hanno contribuito a

darmi motivazione e coraggio in ogni occasione. Una persona straordinaria che merita una menzione d'onore è quell'uragano di mia zia, un eroe dei giorni nostri che con caparbia, coraggio ed il sorriso sempre luminoso affronta ogni giorno una quotidianità complessa di un paese devastato dalla guerra che timidamente cerca di rialzarsi. Là oltre l'Adriatico dove fluisce metà del mio sangue, da dove proviene il mio naso importante, i miei tanti capelli lisci e la mia tenacia.

“Non è vero che non si possa vivere senza una donna. È vero soltanto che senza una donna non si può aver vissuto”. Io ho avuto la fortuna di vivere qualcosa che mi permettesse di pensarla esattamente come Karl Kraus. Benedetta è entrata nella mia vita nel 2013 ed ha riempito ogni istante con la sua presenza e la luce del suo sorriso. In questi tre anni di dottorato (ma anche nei due anni prima) ci siamo sopportati e supportati, abbiamo vissuto momenti durissimi che la vita ci ha riservato troppo presto, ma ne siamo usciti rafforzati ed uniti. Gli ottimi risultati presentati in questa tesi sono indirettamente anche merito suo (ma non troppo, sennò poi “se la tira”). Con la speranza che anche lei voglia provare a seguire questo sentiero.

Il mio carattere e tutto il mio vissuto adolescenziale mi hanno sempre aiutato a conoscere velocemente le persone, ma mai a fidarmi al punto da definirle amici. Gli amici quelli veri si contano sulle dita di una mano, al massimo due. Non faccio nomi, non servono, chi legge sa.

Dopo tre anni in un laboratorio, non esistono colleghi, esiste una famiglia.

Grazie prima di tutto ad Achille per avermi dato l'opportunità di realizzare il mio sogno nel laboratorio di cui è il responsabile. La mia crescita umana e scientifica è passata prima di tutto dalla sua decisione di credere in me per i tre anni del dottorato.

Grazie a Pierangela con cui ho avuto il piacere di sviluppare il progetto sullo sviluppo del protocollo di estrazione green e dalla quale ho imparato tantissimi aspetti di come scrivere un lavoro scientifico accattivante.

Grazie a Giorgio, mio “padre scientifico” in laboratorio che mi ha insegnato a mettere le mani allo strumento ed a dar vita alle mie idee; ma per me è stato anche altro, un riferimento ed una spalla con cui ridere e condividere i momenti più divertenti della quotidianità.

Grazie a Elisabetta che è un po' la mamma di tutti, che ha alimentato la mia infinita sete di caffè e che soprattutto mi ha dato un enorme aiuto nella stesura di alcuni importanti contributi scientifici.

Grazie a Veronica, ultima in questo elenco solo per motivi di ordine anagrafico (spero che le faccia piacere...), con cui ho condiviso praticamente ognuno degli oltre 94608000 secondi vissuti da dottorando. Ai momenti passati insieme associo i ricordi più belli e più intensi, gli esperimenti riusciti e quelli falliti, le corse coi trolley in giro per gli USA e le notti insonni nei tanti aeroporti. Tutto ciò senza considerare le ore spese con pazienza a insegnarmi un'infinità di cose. Grazie.

Grazie alle mie nuove colleghe del laboratorio Aset che tutte le mattine mi vedono arrivare sfinito dalle notti passate a scrivere questa tesi e che nonostante ciò hanno sempre pazienza e gentilezza nell'insegnarmi il mio nuovo lavoro.

Grazie all'Università degli studi di Urbino "Carlo Bo" che ha reso possibile questo percorso dandomi gli strumenti e tutto il supporto necessario. Il mio ringraziamento va a tutte le persone di cui è composta, dal rettore ai ricercatori, dagli amministrativi (che ho stressato all'inverosimile) agli addetti alla portineria.

Grazie alla mia città, che amo con tutto me stesso e che nonostante mille difficoltà riesce a dare un'opportunità a chiunque voglia coglierla.

Grazie a te che ci hai lasciato troppo presto ma che ci guardi dall'alto, ci illumini ogni giorno la strada giusta e ci accarezzi durante il giorno con ogni raggio di sole. Con la tua vita mi hai insegnato il significato della parola dignità come nessun altro è stato capace. Grazie.

Grazie tutte le altre persone che in un modo o nell'altro hanno dato il loro contributo e che hanno reso questo percorso un tatuaggio indelebile del quale vado orgoglioso.

Ora però è tempo di volgere lo sguardo altrove, verso nuove sfide che voglio affrontare con la forza del bagaglio acquisito finora. E la porta aperta al passato, sempre.